



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“ESTUDIO FITOQUÍMICO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIDERMATÓFICA *IN VITRO* DEL LÁTEX DE *Brosimum utile*
(KUNTH C.S.)(LECHE DE SANDI)”**

TESIS DE GRADO

PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR:

ALEX LEONARDO JIMÉNEZ HARO

TUTOR:

Lcda. Karen Acosta, M.Sc.

**RIOBAMBA – ECUADOR
2015**

AGRADECIMIENTO

A todos mis profesores, que gracias a sus conocimientos, logré alcanzar mi formación profesional.

A la Lcda. Karen Acosta, M.Sc., quien con su asesoramiento, tiempo y dedicación, me ha guiado para poder culminar la presente tesis.

Al BQF. Diego Vinuesa, M.Sc., gracias a su colaboración y valiosos conocimientos, se logró superar inconvenientes durante la realización del presente estudio.

A mi familia que siempre ha estado colaborando y apoyándome en la culminación de mis estudios.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mis padres y hermanas, ya que gracias a su colaboración he logrado concluir mis estudios y cumplir así una de mis metas como es ser un Bioquímico Farmacéutico.

A mi hijo que ha sido mi inspiración durante todos estos años de carrera.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: **“ESTUDIO FITOQUÍMICO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIDERMATÓFICA *IN VITRO* DEL LÁTEX DE *Brosimum utile* (KUNTH C.S.)(LECHE DE SANDI)”**, de responsabilidad del señor egresado Alex Leonardo Jiménez Haro, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dra. Nancy Veloz
DECANA FAC. CIENCIAS

Dra. Ana Albuja L., M.Sc.
**DIRECTORA ESCUELA
BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

Lcda. Karen Acosta, M.Sc.
DIRECTOR DE TESIS

BQF. Diego Vinuesa, M.Sc.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

BQF. Fausto Contero
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ab. Bertha Quintanilla
**COORDINADOR
SISBIB - ESPOCH**

NOTA DE TESIS

Yo, Alex Leonardo Jiménez Haro, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

ALEX LEONARDO JIMÉNEZ HARO

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CCF	Cromatografía de Capa Fina
g	Gramo
Ir	Índice de refracción
m.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar
mm	Milímetro
mg	Miligramo
mL	Mililitro
m	Metro
°C	Grado Celsius
Psi	Libras fuerza por pulgada cuadrada
Rf	Factor de Retardamiento
spp	Especies
Tr	Traza
TSA	Agar Soya Trypticase
TSB	Caldo Soya Trypticase
μL	Microlitro
μg	Microgramo
%	Porcentaje

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS
ÍNDICE DE TABLAS
ÍNDICE DE CUADROS
ÍNDICE DE GRÁFICOS
ÍNDICE DE FIGURAS
ÍNDICE DE ANEXOS

INTRODUCCIÓN	- 1 -
1. MARCO TEÓRICO.....	- 1 -
1.1 Género <i>Brosimum</i>	- 1 -
1.1.1 <i>Brosimum utile</i>	- 2 -
1. 2 Clasificación botánica	- 3 -
1. 2.1. Hábitat y distribución	- 3 -
1. 2.2 Descripción botánica	- 3 -
1.4 Dermatofitosis.....	- 5 -
1.7.1 Dermatofitos	- 5 -
1.4.1.1 Clasificación y descripción	- 6 -
1.4.1.2 Infecciones por dermatofitos.....	- 6 -
1.7 Cromatografía en Capa Fina (CCF)	- 10 -
1.7.1 Fundamento teórico.....	- 10 -
2. PARTE EXPERIMENTAL	- 12 -
2.1 Lugar de investigación	- 12 -
2.2 Materiales, equipos y reactivos	- 12 -
2.2.2 Materiales de laboratorio	- 12 -
2.2.3 Equipos	- 13 -
2.2.4 reactivos.....	- 13 -
2.3 Técnicas y métodos	- 14 -
2.3.1 Obtención de la muestra vegetal	- 14 -

2.3.3 Tamizaje fitoquímico	14 -
2.3.3.1 Procedimiento	14 -
2.3.3.2 Descripción de los métodos	18 -
2.3.3.2.1 Ensayo de sudan	18 -
2.3.3.2.2 Ensayo de baljet.....	18 -
2.3.3.2.3 Ensayo de liebermann-buchart	19 -
2.3.3.2.4 Ensayo de dragendorff	19 -
2.3.3.2.5 Ensayo de mayer	20 -
2.3.3.2.6 Ensayo de wagner	20 -
2.3.3.2.7 Ensayo de resinas	20 -
2.3.3.2.8 Ensayo de fehling	20 -
2.3.3.2.9 Ensayo espuma	20 -
2.3.3.2.10 Ensayo cloruro férrico.....	21 -
2.3.3.2.11 Ensayo de ninhidrina	21 -
2.3.3.2.12 Ensayo de borntrager	21 -
2.3.3.2.13 Ensayo de shinoda	22 -
2.3.3.2.14 Ensayo de kedde	22 -
2.3.3.2.15 Ensayo de antocianidinas	22 -
2.3.3.2.16 Ensayo de mucilagos	22 -
2.3.3.2.17 Ensayo de catequinas	23 -
2.3.3.2.18 Ensayo de principios amargos	23 -
2.3.4 Pruebas de solubilidad	23 -
2.3.5 Obtención del extracto purificado alcaloide	23 -
2.3.5.1 Rendimiento de extracción de alcaloides	28 -
2.3.6 Cromatografía en Capa Fina (CCF)	28 -
2.3.6.2 Ensayos en Cromatografía en Capa Fina empleados	28 -
2.3.7 Determinación de las propiedades organolépticas y físicas del extracto alcaloideo	29 -

2.3.7.1 Color	- 29 -
2.3.7.2 Olor.....	- 29 -
2.3.7.3 Aspecto	- 29 -
2.3.8 Pruebas antimicrobianas <i>in vitro</i>	- 30 -
2.3.8.1 Esterilización de materiales	- 30 -
2.3.9.1 Preparación de caldo de cultivo Soya Tripticasa (TSB)	- 30 -
2.3.9.2 Suspensión de microorganismos ATCC	- 30 -
2.3.9.3 Siembra de microorganismos ATCC.....	- 31 -
2.3.9.4 Almacenamiento de cepas ATCC reactivadas	- 31 -
2.3.10 Metodología para el estudio de la actividad antifúngica.....	- 32 -
2.3.11.1 Difusión en Agar con Disco.....	- 32 -
2.3.11.1.1 Procedimiento.....	- 32 -
2.3.11 Metodología para el estudio de la actividad antibacteriana	- 33 -
2.3.11.1 Método de Mitscher.....	- 33 -
2.3.11.1.1 Preparación de las placas	- 33 -
2.3.11.1.2 Estriado de microorganismos	- 34 -
2.3.12 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	- 35 -
3. RESULTADOS Y DISCUSIONES	- 36 -
3.1 Tamizaje fitoquímico	- 36 -
3.2 Pruebas de solubilidad.....	- 40 -
3.3 Obtención del extracto puro de alcaloides	- 40 -
3.3.1 Rendimientos	- 41 -
3.4 Cromatografía en Capa Fina para alcaloides	- 42 -
3.5 Determinación de las propiedades organolépticas y físicas del extracto alcaloideo	- 44 -
3.7 Determinación de la actividad antibacteriana del extracto alcaloideo.....	- 44 -
3.7.1 Método de Mitscher	- 45 -
3.8 Determinación de la actividad antifúngica del extracto alcaloideo	- 49 -

3.8.1 Método Difusión en Agar con Disco (hongos)	- 49 -
CONCLUSIONES	- 52 -
RECOMENDACIONES	- 54 -
RESUMEN	- 1 -
BIBLIOGRAFÍA	- 55 -
ANEXOS.....	- 60 -

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO No. 1	Clasificación científica de la especie <i>Brosimum utile</i>	4
CUADRO No. 2	Ensayos de identificación de los diferentes metabolitos.....	7
CUADRO No. 3	Infecciones producidas por los principales dermatofitos.....	9
CUADRO No. 4	Características organolépticas y físico químicas de látex puro de <i>Brosimum utile</i> . Laboratorio de Productos Naturales. Facultad de Ciencias. ESPOCH.....	38
CUADRO No. 5	Tamizaje fitoquímico del extracto etéreo de <i>Brosimum utile</i> . Laboratorio de productos naturales. Facultad de Ciencias. ESPOCH.	38
CUADRO No. 6	Tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico de <i>Brosimum utile</i> . Laboratorio de Productos Naturales. Facultad de Ciencias. ESPOCH.	39
CUADRO No. 7	Tamizaje fitoquímico del extracto acuoso de <i>Brosimum utile</i> . Laboratorio de Productos Naturales. Facultad de Ciencias. ESPOCH.....	40
CUADRO NO. 8	Pruebas de solubilidad con el látex de <i>Brosimum utile</i> . Laboratorio de productos naturales. Facultad de Ciencias. ESPOCH.....	41
CUADRO NO. 9	Propiedades organolépticas y físicas del extracto alcaloideo. Laboratorio de productos naturales. Facultad de Ciencias. ESPOCH.	46
CUADRO No. 10	Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto alcaloideo de <i>Brosimum utile</i> (látex) por el Método de Mitscher. <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> . Laboratorio de Desarrollo e Investigación. Facultad de Ciencias. ESPOCH.	47
CUADRO No. 11	Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto alcaloideo de <i>Brosimum utile</i> (látex) por el Método de Mitscher. Concentraciones de 200 y 2000 µg Laboratorio de Desarrollo e Investigación. Facultad de Ciencias. ESPOCH.	47

CUADRO No. 12	Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto alcaloideo de <i>Brosimum utile</i> (látex) por el Método de Mitscher. Concentraciones de 1000 a 2000 µg. Laboratorio de Desarrollo e Investigación. Facultad de Ciencias. ESPOCH.	48
CUADRO No. 13	Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto alcaloideo de <i>Brosimum utile</i> (látex) por el Método de Mitscher. Concentraciones de 1400 a 2000 µg. Laboratorio de Desarrollo e Investigación. Facultad de Ciencias. ESPOCH.	49
CUADRO No. 14	Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto alcaloideo de <i>Brosimum utile</i> (látex) por el Método de Mitscher. <i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Pseudomona aeruginosa</i> Laboratorio de Desarrollo e Investigación. Facultad de Ciencias. ESPOCH.	50
CUADRO No. 15	Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto alcaloideo de <i>Brosimum utile</i> (látex) por el Método de Mitscher. <i>Cándida albicans</i> . Laboratorio de Desarrollo e Investigación. Facultad de Ciencias. ESPOCH.	51
CUADRO No. 16	Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto alcaloideo de <i>Brosimum utile</i> (látex) por el Método de Difusión en agar con disco. <i>Trichophyton rubrum</i> y <i>Epidermophyton floccosum</i> . Laboratorio de Desarrollo e Investigación. Facultad de Ciencias. ESPOCH	51
CUADRO No. 17	Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto alcaloideo de <i>Brosimum utile</i> (látex) por el Método de Difusión en agar con disco. Medición de halos. Laboratorio de Desarrollo e Investigación. Facultad de Ciencias. ESPOCH	52

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO No. 1	Árbol de la especie <i>Brosimum utile</i> (a), tronco y (b) raíces.	5
GRÁFICO No. 2	Modelo de inoculación por el Método de Mitscher.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA No. 1	Extracción sucesiva del material vegetal para la aplicación de técnicas del tamizaje fitoquímico.....	17
FIGURA No. 2	Esquema de las reacciones a realizar en el extracto de éter etílico.....	18
FIGURA No. 3	Esquema de las reacciones a realizar en el extracto alcohólico.....	19
FIGURA No. 4	Esquema de las reacciones a realizar en el extracto acuoso.....	20
FIGURA No. 5	Método No.1 para la obtención del extracto purificado de alcaloides de <i>Brosimum utile</i>	26
FIGURA No. 6	Método No.2 para la obtención del extracto purificado de alcaloides de <i>Brosimum utile</i>	28

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO No. 1	Recolección de la materia prima.....	66
FOTO No. 1	Ciudad de Lago Agrio, Parroquia Dureno, Nacionalidad Cofán, identificación de la especie <i>Brosimum utile</i>	66
ANEXO No. 2	Materia prima.....	67
FOTO No. 2	Látex de la especie <i>Brosimum utile</i>	67
ANEXO No. 3	Obtención de los extractos.....	67
FOTO No. 3	Obtención de extractos para ser utilizados en el tamizaje fitoquímico.....	67
ANEXO No. 4	Tamizaje fitoquímico.....	68
FOTO No. 4	Pruebas del tamizaje realizadas con los diferentes extractos de <i>Brosimum utile</i>	68
FOTO No. 5	Prueba de Liebermann-Buchart positiva en el extracto etéreo, presencia de triterpenos o esteroides.....	69
FOTO No. 6	Prueba de Resinas positiva en el extracto alcohólico, presencia de gomas y resinas.....	69
FOTO No. 7	Prueba de alcaloides en el extracto acuoso, positivo para Dragendorff, Mayer y Wagner.....	70
ANEXO No. 5	Obtención del extracto alcaloideo.....	70
FOTO No. 8	Filtración al vacío de la mezcla látex + metanol.....	70
FOTO No. 9	Basificación del extracto con NH ₄ OH(c) hasta pH 9.....	70
FOTO No. 10	Purificación y separación entre la fase orgánica y la acuosa con CHCl ₃	70
FOTO No. 11	Concentración al vacío de la fase orgánica en el rotavapor a 40°C.....	71

FOTO No. 12	TLC confirmación del alcaloide Bufotenina.....	71
ANEXO No. 6	Pruebas <i>in-vitro</i> Método de Mitscher.....	72
FOTO No. 13	Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto alcaloideo de <i>Brosimum utile</i> (látex) por el método de Mitscher. Concentraciones de 200 Y 2000 µg, blanco y control positivo (+). <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>	72
FOTO No. 14	Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto alcaloideo de <i>Brosimum utile</i> (látex) por el método de Mitscher. Concentraciones de 200 a 2000 µg. <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>	73
FOTO No. 15	Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto alcaloideo de <i>Brosimum utile</i> (látex) por el método de Mitscher. Concentraciones de 1500 a 2000 µg. <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>	74
FOTO No. 16	Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto alcaloideo de <i>Brosimum utile</i> (látex) por el método de Mitscher. Concentraciones de 1000 a 2000 µg. <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	75
ANEXO No. 7	Determinación de la actividad antidermatofica del extracto alcaloideo.....	76
FOTO No. 17	Siembra de hongos dermatofitos <i>Trichophyton rubrum</i> y <i>Epidermophyton floccosum</i>	76
FOTO No. 18	Determinación de la actividad antidermatofica del extracto alcaloideo de <i>Brosimum utile</i> (látex) por el método de Difusión en Agar con Disco. <i>Epidermophyton floccosum</i> (Primer ensayo).....	76

FOTO No. 19	Determinación de la actividad antidermatófica del extracto alcaloideo de <i>Brosimum utile</i> (látex) por el método de Difusión en Agar con Disco. <i>Epidermophyton floccosum</i> . (Segundo ensayo).....	77
FOTO No. 20	Determinación de la actividad antidermatófica del extracto alcaloideo de <i>Brosimum utile</i> (látex) por el método de Difusión en Agar con Disco. <i>Trichophyton rubrum</i> . (Primer ensayo).....	77
FOTO No. 21	Medición de los halos de inhibición en milímetros de la actividad antidermatófica del extracto alcaloideo de <i>Brosimum utile</i> (látex) por el método de Difusión en Agar con Disco. <i>Epidermophyton floccosum</i> y <i>Trichophyton rubrum</i>	78

RESUMEN

Se ejecutó el estudio fitoquímico y la evaluación de la actividad antidermatófica de la especie *Brosimum utile*. La parte de la planta de *Brosimum utile* que se utilizó fue el látex, el mismo que fue recogido en la parroquia Dureno, de la nacionalidad Cofán. Al realizar el estudio fitoquímico, se logró identificar compuestos como terpenos, saponinas, gomas, grasas, resinas y alcaloides, siendo este último el de mayor importancia e interés del presente estudio. Se obtuvo un extracto alcaloideo puro con un rendimiento de 25 mg por cada 100 mL de látex, equivalente a una concentración de 2000 ppm (partes por millón). Posteriormente, se identificó por cromatografía en capa fina (CCF) la presencia de alcaloides, como la bufotenina o similares. Se realizaron pruebas *in-vitro* del extracto puro de alcaloides en bacterias y hongos. Estos microorganismos fueron reactivados a partir de cepas puras ATCC (American Type Culture Collection). Las bacterias en las que se realizaron las pruebas fueron, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomona* y *Klebsiella*, usando la técnica de Mitscher. Además se trabajó con hongos dermatofitos como, *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum* y *Cándida albicans*, usando el método de Difusión en Disco. Mediante las pruebas *in vitro* se evidenció que el extracto metanólico tiene actividad antimicrobiana y antifúngica, con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 1600 y 2000 µg, respectivamente, de extracto alcaloideo puro, frente a agentes patógenos como bacterias y hongos dermatofitos. La investigación realizada origina nuevas perspectivas de estudio por lo surge la necesidad de desarrollar un fitofármaco que eliminen estos agentes patógenos y ayuden al bienestar de la salud.

SUMMARY

Phytochemical's study was performed. After this an evaluation was made about antidermatofica activity of the "*Brosimum utile*'s specie. Latex was the part that I used for this process, the same that I recollected in Dureno's parish, in Cofan's nationality. When I made phytochemical's study I achieved compounds as: terpenes, saponins, gums, greases, resins, alkaloids then I obtained an alkaloid pure extract with a yield of 25 mg per 100 mL of latex, equivalent to a concentration of 2000 ppm (part per million) then I saw the alkaloid's presence as "bufotenin" or something like that, by thin layer chromatography (TLC). Bacteria and fungi extracted a pure "in-vitro" alkaloid in tests were performed. These microorganisms were reactivated from inbred strains ATCC (American Type Culture Collection). Bacteria in which the tests were performed, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa*, using the Mitscher's. Addition worked with dermatophyte fungi as: *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum*. In "in-vitro's test". I saw that the methanol's extract had antimicrobial and antifungal activity with a minimal inhibitory concentration (MIC) of 1600 and 2000 µg, respectively, and fungi dermatophytes. Research conducted study leads to new perspective to develop a phytodrug to eliminate these pathogens and help the human's health.

INTRODUCCIÓN

Las plantas, desde la antigüedad, han sido utilizadas tanto en la alimentación como en el tratamiento de enfermedades. En el caso concreto de los pueblos de la Región Amazónica del Ecuador, que cuenta con una abundante biota, éstos han transmitido su conocimiento ancestral y el uso etnobotánico de las plantas, heredándolo de generación en generación. (Brack EA. 2000)

Esta zona del territorio nacional está poblada en su mayoría por diferentes etnias poseedoras de muchos conocimientos empíricos, las cuales utilizan gran cantidad de plantas con aplicaciones medicinales. (Brack EA. 2000)

Brosimum utile es un árbol monoico que llega en promedio a medir hasta 50 m de alto y se caracteriza por poseer un látex blanco. Además, se emplea en la alimentación, elaboración de artesanías y como recurso maderable. (Brack EA. 2000)

El látex de *Brosimum utile* posee un olor fuerte y es irritante al producirse contacto directo con la piel. Es empleado en el tratamiento de cicatrización de fracturas de huesos, como antidiarreico y purgante. Cabe añadir que el látex caliente se utiliza para impermeabilizar canoas y botes. (Brack EA. 2000)

La dermatofitosis es una enfermedad micótica superficial causada por hongos que afectan a la piel, a nivel de la epidermis, llegando a invadir principalmente el tejido queratinizado como las uñas y el pelo, tanto del hombre como de algunos animales. (Hernández-Hernández. 2010)

Esta enfermedad ha llegado a provocar a nivel mundial entre 300 a 500 millones de casos clínicos cada año. Esto se debe a que un gran número de la población mundial está distribuida en zonas subtropicales y tropicales, donde el riesgo de contraer dermatofitosis es elevado. Además, se observan como enfermedad oportunista en casos de SIDA, trasplantes de órganos, infecciones, entre otras. (Hernández-Hernández. 2010)

Se han realizado estudios acerca de la composición fitoquímica de compuestos de *B. utile*, comprobando su efectividad como protector gástrico, sin embargo no se ha justificado su efecto como agente antidermatofítico. Cabe recalcar que, estudios previos, centrados en otra especie de mismo género (*Brosimum rubescens*) conocida como pali sangre, donde se observa que aquella posee actividad antidermatofítica, lo que se traduce en un indicativo que la especie del presente estudio, posiblemente podría presentar resultados positivos. (Hernández-Hernández. 2010)

CAPITULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 GÉNERO *Brosimum*

La planta *Brosimum utile* pertenece al género *Brosimum*, que se halla dentro de la familia de las Moraceae, siendo nativa de las regiones tropicales del continente americano. Su fruto fue usado antiguamente en la civilización maya como fuente comestible, su látex era consumido como bebida nutritiva y su madera para la construcción de armas de defensa. (Davidse, G. et al. 2013)

Las especies más conocidas y utilizadas del género *Brosimum*, que existen en las zonas tropicales de la Amazonía de América son: *B. alicastrum*, *B. costaricanum*, *B. discolor*, *B. gaudichaudii*, *B. glaziovii*, *B. guianense*, *B. ovatifolium*, *B. parinarioides*, *B. potabile*, *B. rubescens* y *B. utile*. (Davidse, G. et al. 2013). La mayor parte de estas especies tienen usos maderables, debido a la magnitud de sus troncos que llegan a medir hasta 50 metros. (Burns, R.M. y Mosquera, M. 1998)

Las especies que tienen registradas actividades biológicas son: *B. alicastrum* que es usada en medicina principalmente para el tratamiento del asma y otras afecciones que atacan a las vías respiratorias; *B. rubescens*, utilizada en tratamientos caseros, específicamente su látex que es efectivo para contrarrestar afecciones fúngicas; y *B. utile*, cuyo látex es usado como protector gástrico y en infecciones fúngicas. (Burns, R.M. y Mosquera, M. 1998)

1.1.1 *Brosimum utile*

Esta especie también conocida con los nombres populares de sande, leche de sande y *yanchama* colorada, forma parte de la familia de las Moráceas y se encuentra en la Amazonía, de Ecuador, Colombia, Perú y Venezuela. Su clasificación taxonómica se explica a continuación en el cuadro No. 1. (Davidse, G. et al. 2013)

Cuadro No. 1 CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA DE LA ESPECIE *Brosimum utile*

Clasificación científica de <i>Brosimum utile</i>	
Reino:	Plantae
Subreino:	Tracheobionta
División:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Orden:	<i>Rosales</i>
Familia:	Moraceae
Tribu:	<i>Dorstenieae</i>
Género:	<i>Brosimum</i>
Reino:	<i>Plantae</i>
Subreino:	<i>Tracheobionta</i>
División:	<i>Magnoliophyta</i>

FUENTE: (GRIN. 2009)

El látex de esta especie es utilizado por los lugareños de la Amazonía para impermeabilizar canoas y botes, además como fuente de fibra denomina *yanchama* colorada. La drupa de sus frutos sirve como alimento y también es utilizado como sustituto de la leche. Su madera se usa para construcción de casas y de mangos para armas de casería. (Burns, R.M. y Mosquera, M. 1998)

En medicina, este látex es utilizado para curar úlceras, para el tratamiento de cicatrización de fracturas de huesos, como antidiarreico y como un astringente. Su

madera se usa en infusión para combatir hemorragias posparto y su corteza sirve como esterilizante. (Burns, R.M. y Mosquera, M. 1998)

1. 2 CLASIFICACIÓN BOTÁNICA

1. 2.1. Hábitat y distribución

El área en la que se encuentra distribuida la especie de *B. utile* tiene una extensión que va desde la cuenca del río Amazonas en Colombia, Ecuador y Perú hasta América Central. Debido al nivel regional y a la extensa distribución, esta especie ha llegado a ocasionar diferencias morfológicas, por lo cual se describe a la especie como polimorfa. El hábitat de esta especie se limita principalmente a los bosques húmedos tropicales en alturas hasta 300 msnm. (BERG, C. 1992)

1. 2.2 Descripción botánica

La especie *B. utile* se caracteriza por presentar grandes dimensiones, alcanzan alturas que van desde los 35 hasta 50 m (observar grafico No. 1 (a)), presenta raíces anchas que llegan hasta 5 m de altura, estas raíces son tablares ya que crecen cercanas al suelo y se abren de forma vertical (observar grafico No. 1 (b)). (BERG, C. 1992)

(a)

(b)

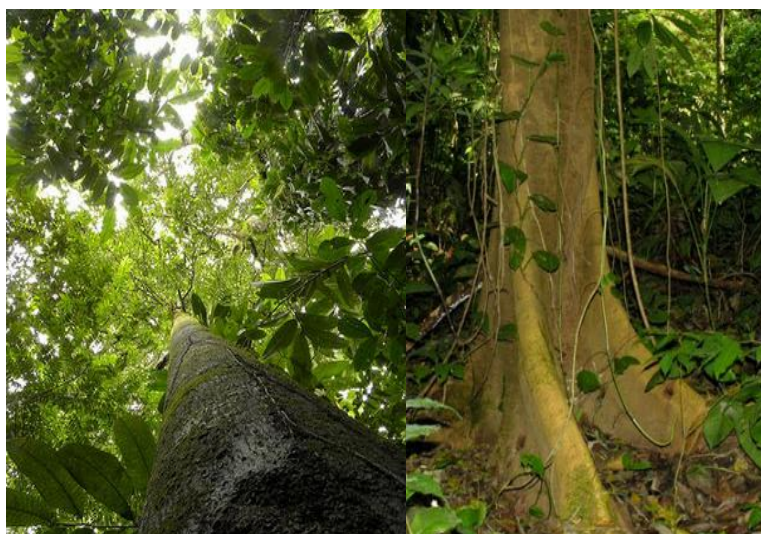


GRAFICO NO. 1

ÁRBOL DE LA ESPECIE *Brosimum utile*
(a) TRONCO y (b) RAÍCES. (BERG, C. 1992)

Sus hojas adquieren formas simples y alternas con un borde entero, sus flores son de color blanco y tienen una apariencia casi esférica. Sus frutos y semillas en su estado maduro son de color marrón oscuro y contienen una sola semilla.

El período de maduración de esta especie suele variar algunos meses; sin embargo, florece entre los meses de noviembre y enero, algunos autores presumen que esta especie es anemógama; es decir, el polen es transportado por el viento. (Trujillo, E. 1995)

1.3 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

El tamizaje fitoquímico es una de las primeras etapas que se realiza con el propósito de determinar cualitativamente los principales metabolitos secundarios presentes en la muestra vegetal que se va a estudiar, mediante el uso de diferentes solventes, ya sea agua, alcohol o éter. (Bruneton, J. 2001)

El tamizaje fitoquímico se realiza con los solventes apropiados y mediante la aplicación de reacciones de precipitación y color. Son evaluaciones rápidas, de bajo costo, sencillas y reproducibles. (Bruneton, J. 2001)

Este método ayudará a tener una orientación, para poder interpretar y cuantificar los metabolitos que sean de nuestro interés, como podemos observar en el cuadro No. 2. (Bruneton, J. 2001)

CUADRO NO. 2

ENSAYOS DE IDENTIFICACIÓN DE LOS DIFERENTES METABOLITOS. (BRUNETON, J. 2001)

METABOLITOS	ENSAYO	FASE
Compuestos grasos	Sudán	Etéreo
Cumarinas, Heterosidos, Cardiotonicos y Sesquiterpenolactonas	Baljet	Etéreo
Triterpenos y/o esteroides	Lieberman-Burchard	Etéreo
		Alcohólico
Catequinas	Catequinas	Alcohólico
Antocianidinas	Antocianidinas	Alcohólico
Resina	Resina	Alcohólico
Azucares reductores	Fheling	Alcohólico
Compuestos fenólicos, Taninos	Cloruro Férrico	Alcohólico
		Acuoso
Saponinas	Espuma	Alcohólico
Naftoquinonas y Antraquinonas	Borntrager	Alcohólico
Flavonoides	Shinoda	Alcohólico
		Acuoso
Alcaloides	Mayer	Acuoso
Alcaloides	Wagner	Acuoso
Alcaloides	Dragerndorf	Acuoso

1.4 DERMATOFITOSIS

1.4.1 Dermatofitos

Las micosis superficiales son producidas principalmente por hongos llamados dermatofitos, ya que estos poseen la capacidad de digerir la queratina cornificada y así invadir superficies como la piel, uñas y pelo. Afectan tanto a hombres como animales y habitan principalmente en el suelo. (Zinsser, H. 1996).

Una de las características de los dermatofitos es que aquellos no invaden zonas por debajo de la epidermis. Pertenecen a este grupo los géneros *Epidermophyton*, *Microsporum* y *Trichophyton*. (Zinsser, H. 1996).

1.4.1.1 Clasificación y descripción

Existen tres especies principales de los dermatofitos que producen micosis:

1- *Microsporum nannzia*: Estos contienen macroconidios que tienen una forma de espora predominante, estas especies infectan comúnmente la piel y el cabello pero rara vez las uñas. Las colonias formadas llegan a dar un color pardo, y suelen dar textura algodonosa después de cuatro semanas de cultivo. Se desarrollan en agar Sabouraud a temperatura ambiente. (Zinsser, H. 1996).

2- *Trichophyton rubrum*: La espora principal de este género está conformada por los microconidios, adoptan diferentes morfologías de pigmentación y colonia según la especie, se usa diferentes medios nutricionales, con el fin de lograr la identificación de las especies. (Zinsser, H. 1996).

3- *Epidermophyton floccosum*: su característica principal es la formación de macroconidios que tienen la forma de un mazo con una o cinco células, formando colonias de color verdoso-amarillento. Este hongo logra invadir la piel y las uñas, pero nunca el cabello. (Zinsser, H. 1996).

Estos tres géneros mencionados, pertenecen a los hongos queratinofílicos (que digieren la queratina), estos pueden adaptarse para crecer y metabolizar en presencia de oxígeno, por lo que se les denomina aerobios facultativos. (Zinsser, H. 1996).

1.4.1.2 Infecciones por dermatofitos

La mayor parte de estas especies se encuentran en el suelo, pero en contacto con humanos y animales producen patologías. A continuación se describe las especies más comunes de dermatofitos y sus principales enfermedades que produce (Zinsser, H. 1996).

CUADRO No 3. INFECCIONES PRODUCIDAS POR LOS PRINCIPALES DERMATOFITOS. (ZINSSER, H. 1996).

ESPECIE	ENFERMEDAD
<i>Microsporum</i>	Invaden pelo y cabello; rara vez uñas
<i>Microsporum canis</i>	Dermatomicosis de animales; lesiones en anillo; tina capites
<i>Microsporum audouini</i>	Tina capites epidérmica de los niños
<i>Microsporum gyseum</i>	Lesiones en anillos; tina capites
<i>Trichophyton</i>	Invade piel; pelo; y uñas
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Pie de atleta, diversas infecciones de piel y uñas
<i>Trichophyton rubrum</i>	Pie de atleta, sicosis, tiña cruris
<i>Trichophyton tonsurans</i>	Tina capites
<i>Trichophyton schoenleini</i>	Favus
<i>Epidermophyton</i>	Invade piel, uñas, pero no el pelo,
<i>Epidermophyton floccosum</i>	Pie de atleta, tina cruris,

Una de las causas de morbilidad y mortalidad más comunes son las infecciones invasivas producidas por hongos en pacientes con inmunosupresión que han recibido trasplante de órganos. (Aman, S. et al. 2003)

Este problema se explica por la administración de forma inadecuada de medicamentos fungistáticos, debido a que se utilizan por largos periodos de tiempo y permiten la formación de patógenos resistentes frente a compuestos antimicóticos. (Aman, S. et al. 2003)

En lo que se refiere al tratamiento de hongos filamentosos y dermatofitos, son muy escasos en el mercado medicamentos antifúngicos de este tipo. Entre los más comunes para hongos en forma general, se encuentran los de tipo azol y triazol como el fluconazol,

los de tipo polieno como las nistatinas y otros, de escaso uso, como son las sordarinas. (Aman, S. et al. 2003)

En esta última década se han incrementado el número de infecciones producidas por hongos patógenos, por lo cual se ha introducido al mercado nuevos medicamentos antifúngicos con actividad a nivel sistémico, de los cuales solamente seis tiene licencia para ser usados, por tal motivo se ha intensificado la búsqueda y el descubrimiento de nuevos fármacos antifúngicos. (Gustavo, E. 2008)

El descubrimiento de nuevos antifúngicos se basa en la exploración de diferentes fuentes de compuestos biactivos, entre las que se encuentran las especies de plantas conocidas hasta el momento que oscilan entre 250.000 y 500.000. Éstas sintetizan metabolitos secundarios como las fitoalexinas y fitoanticipinas que son utilizadas como medio de defensa frente a agentes fitopatógenos, entre estos los hongos. (Taylor, C. 1998).

1.5 PRINCIPALES METABOLITOS SECUNDARIOS CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.

Las plantas como mecanismo de defensa tienen la capacidad de sintetizar diferentes sustancias. De esta manera, llegan a adaptarse y protegerse de agentes externos dañinos. (Malagon, O. et al. 2003)

Los fenoles y polifenoles, gracias a sus grupos representantes como son el ácido caféico y el ácido cinámico, poseen actividad antibacteriana, por la inhibición enzimática contra los microorganismos. (Bazalar, D. 1998)

Los taninos por su poder astringente y las quinonas que son muy reactivas, tienen un amplio rango de actividad antimicrobiana, ya que actúan sobre las adhesinas que se encuentran sobre la superficie de las bacterias inhibiendo así su colonización. (Bazalar, D. 1998)

Las flavonas, flavonoides y flavonoles, son compuestos que sintetizan las plantas frente a infecciones microbianas, cuyo mecanismo de acción es formar complejos con proteínas extracelulares y atacando a la pared celular de los microorganismos. (Bazalar, D. 1998)

Otros metabolitos como los terpenoides y aceites esenciales poseen actividad contra hongos, bacterias, virus y protozoarios, ya que estos compuestos producen una perturbación sobre la superficie de la membrana celular debido a su naturaleza lipofílica y producen la muerte del microorganismo. (Bazalar, D. 1998)

Los alcaloides de la especie *Solanum* tienen actividad frente a infecciones intestinales relacionadas con el SIDA. Otros alcaloides poseen actividad potencialmente efectiva contra parásitos como *Entamoeba* y *Giardia*. Así, los alcaloides poseen un amplio rango de actividad antibacteriana. (Bazalar, D. 1998).

Por otro lado, en un ensayo se utilizaron extractos, del látex de eucalipto (*Eucalyptus*) y se comprobó que metabolitos secundarios de naturaleza terpénica y compuestos fenólicos, poseen alta actividad antimicótica, luego del proceso in vitro frente a *Cándida albicans* y *Trichophyton mentagrophytes*. (Dorman, H. y Deans, S. 2000)

Finalmente, otro de los metabolitos secundarios principales que poseen gran actividad antimicótica son las quinonas. (Malagon, O. et al. 2003)

1.6 BACTERIAS UTILIZADAS EN PRUEBAS IN VITRO

Staphylococcus aureus.- Bacteria Gram-positiva anaerobia facultativa, productora de catalasa y coagulasa, se encuentra ampliamente distribuida en el mundo entero, ya que de cada tres personas una la posee, aunque no muestren síntomas de infección. Pueden producir diferentes enfermedades como infecciones respiratorias, faringitis, conjuntivitis, neumonía entre otras. (Kumate, J. 2008)

Escherichia coli.- Pertenece a las enterobacterias, es uno de los microorganismos más estudiados por el ser humano, que se encuentran principalmente en el intestino de los animales y en las aguas negras. Sin embargo, esta bacteria es necesaria para el correcto

funcionamiento del proceso digestivo, además de producir otros beneficios como la producción de vitaminas B y K. (Kumate, J. 2008)

Pseudomonas aeruginosa.- Es un bacilo Gram-negativo aerobio a la familia perteneciente a la familia *Pseudomonadaceae*, produce catalasa, oxidasa y aminoácidos a partir de la arginina. Producen infecciones muy graves en el ser humano, colonizan generalmente órganos dañados, como heridas quirúrgicas, quemaduras, aparato respiratorio. (Kumate, J. 2008)

Klebsiella pneumoniae.- Es una bacteria Gram-negativa perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, es muy importante a nivel clínico ya que son las causantes de enfermedades infecciosas oportunistas. Producen efectos sobre la salud humana en pacientes que se hallan en unidades de cuidado intensivo, ya sea por quemaduras, heridas externas, pacientes de edad avanzada, etc. (Kumate, J. 2008)

1.7 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (CCF)

1.7.1 Fundamento teórico

La cromatografía en capa fina (CCF) es una técnica analítica sencilla y rápida de realizar. Ayuda a la determinación del grado de pureza que puede existir en un compuesto, de este modo se puede conocer la efectividad de una etapa de purificación. (Chang, R. 2010)

La muestra que se desea analizar se siembra en un extremo de una lámina de aluminio, la cual contiene una capa adsorbente, conocida como fase estacionaria. Luego esta lámina se coloca en una cubeta de vidrio cerrado, la cual contiene el eluyente o fase móvil. Mientras la muestra asciende por capilaridad, por medio del adsorbente, se origina un reparto diferencial por los productos presentes en la muestra. (Chang, R. 2010)

Los dos adsorbentes más utilizados en la fase estacionaria son la alúmina (Al_2O_3) y el gel de sílice (SiO_2), los 2 de carácter polar. (Chang, R. 2010)

Para aumentar la polaridad de la fase móvil, depende del orden de elución de un compuesto, es por eso que se usa un disolvente único o dos miscibles de diferente polaridad. Los eluyentes más usados en orden creciente de polaridad son: hexano, tetraclorometano, cloroformo, diclorometano, acetato de etilo, acetona, 2-propanol, metanol, agua. Estos disolventes se caracterizan por tener bajos puntos de ebullición y viscosidad, lo que permite que se muevan con rapidez. (Chang, R. 2010)

Para evaluar los resultados de la cromatografía en capa fina es necesario determinar el Factor de Retardamiento (R_f), es decir, la relación entre la distancia recorrida por el compuesto (X) y la distancia recorrida por el eluyente (Y). La distancia recorrida por el compuesto se mide desde el centro de la mancha. (Chang, R. 2010)

Es recomendable escoger un eluyente en el que los componentes de la mezcla presenten un R_f promedio entre 0.3-0.5. Para compuestos poco polares, es recomendable usar un disolvente apolar como el hexano. En el caso de compuestos con polaridad media, se debe utilizar mezclas hexano/acetato de etilo en distintas proporciones. Los compuestos más polares, se aconseja disolventes más polares como mezclas dediclorometano/metanol en distintas proporciones. (Chang, R. 2010)

CAPITULO II

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 LUGAR DE INVESTIGACIÓN

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Productos Naturales y en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.2 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

2.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizó 2000 mL de látex de la planta *Brosimum utile*. La muestra vegetal fue obtenida en la provincia de Sucumbíos, ciudad de Lago Agrio, en la parroquia Dureno, Nacionalidad Cofán, que se encuentra a una altitud de 300 m.s.n.m y presenta una temperatura promedio entre 27 ± 29 °C.

2.2.2 MATERIALES DE LABORATORIO

-	Balones aforados
-	Embudos Buchner
-	Embudos de separación
-	Embudo simple
-	Gradilla
-	Matraz Kitasato
-	Mangueras
-	Papel aluminio
-	Papel filtro

-	Pipetas volumétricas
-	Pinza para tubo
-	Probetas
-	Reverbero
-	Trípodes
-	Termómetro
-	Tubos de ensayo
-	Varilla de agitación
-	Vasos de precipitación

2.2.3 EQUIPOS

-	Balanza analítica
-	Bomba de vacío
-	Estufa
-	pH-metro
-	Evaporador rotatorio

2.2.4 REACTIVOS

-	Ácido clorhídrico
-	Ácido sulfúrico
-	Agua destilada
-	Alcohol N-amílico
-	Anhídrido acético
-	Carbonato de sodio
-	Cloroformo
-	Cloruro de sodio
-	Etanol
-	Éter dietílico
-	Hidróxido de sodio
-	Magnesio metálico
-	Metanol anhidro
-	Reactivo de Dragendorff
-	Reactivo de Fehling
-	Reactivo de Mayer
-	Reactivo de Wagner
-	Reactivo Sudan III

2.3 TÉCNICAS Y MÉTODOS

2.3.1 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA VEGETAL

Se utilizó el látex *Brosimum utile*, el mismo que fue recogido directamente de forma fresca, realizando un corte en el tronco del árbol y se guardó en un frasco ámbar para ser protegido de la luz.

Una vez obtenido el látex de *B. utile*, se empezó con el acondicionamiento de la muestra el cual consistió en conservar el látex en refrigeración hasta su posterior uso y la obtención de los diferentes extractos durante el tamizaje fitoquímico.

2.3.2 Características organolépticas

Se realizó este análisis con el fin de determinar las características físicas de la materia prima (látex), y de este modo conocer su sabor, textura, olor, color y pH, parámetros que ayudaron para determinarlas características de partida del látex en el estudio.

2.3.3 Tamizaje fitoquímico

Para la obtención de los extractos etéreo, acuoso y alcohólico, se realizaron extracciones sucesivas con solventes de polaridad creciente con la finalidad de lograr un mayor agotamiento del material vegetal seco. (Miranda, M. 2006)

2.3.3.1 Procedimiento

La planta fresca, seca o el residuo de la extracción; se sometieron a tres extracciones sucesivas según el esquema de la Fig. No. 1, a cada extracto I, II y III, se le midió el volumen obtenido y se calculó su concentración; es decir, gramos de sustancias extraídas por mililitro de extracto. Para ello, se tomó una alícuota de 5 mL y se pasó a una cápsula previamente tarada, se evaporó a sequedad en baño maría y se pesó nuevamente. (Miranda, M. 2006)

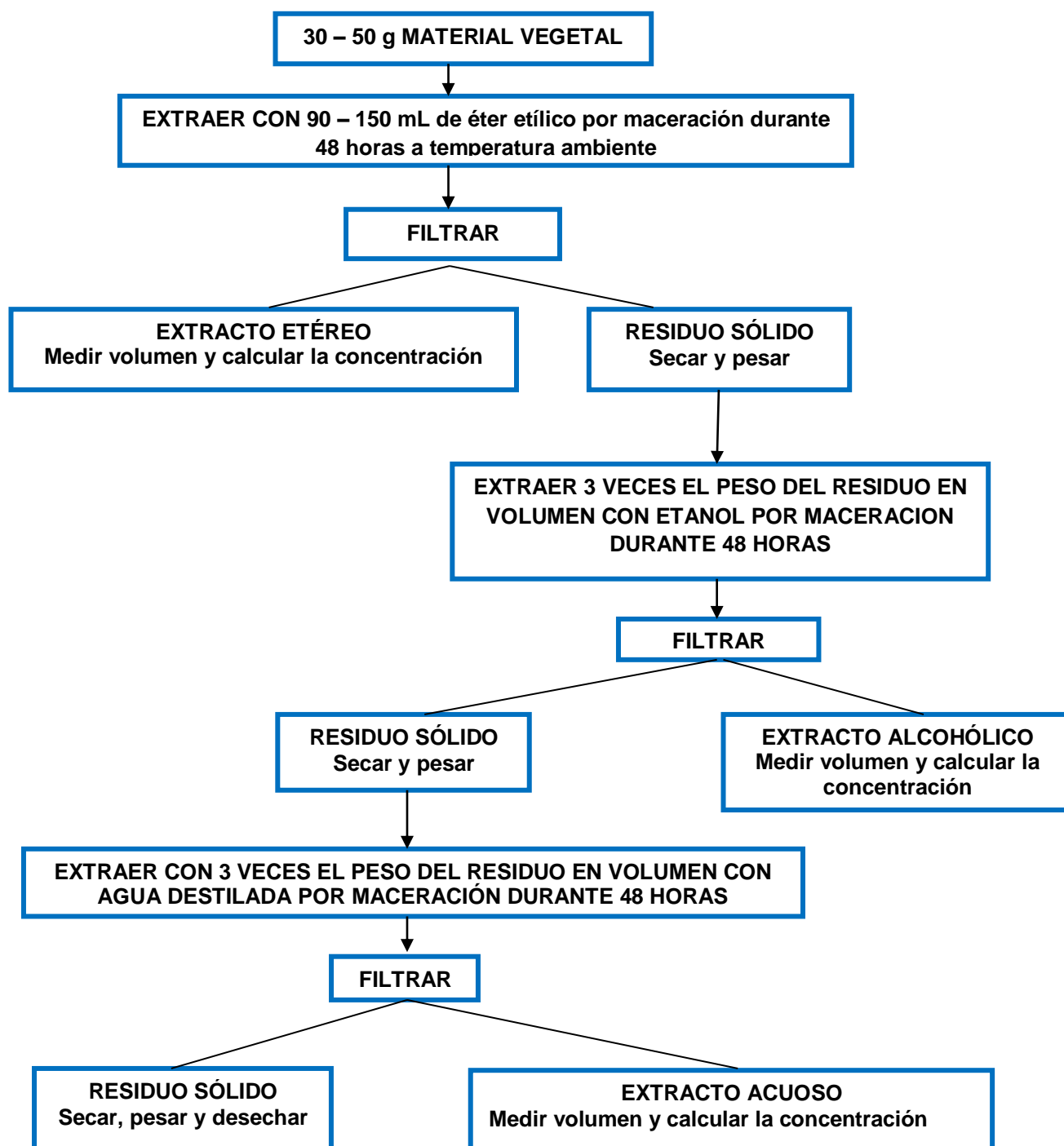


FIGURA. No. 1 EXTRACCIÓN SUCESIVA DEL MATERIAL VEGETAL PARA LA APLICACIÓN DE TÉCNICAS DEL TAMIZAJE FITOQUÍMICO. (MIRANDA, M. 2006)

Posteriormente, se sometió a cada extracto por separado de acuerdo a los esquemas representados en las Figuras N° 2, 3 y 4.

Al inicio, se tomó el extracto etéreo y fue dividido en 6 porciones, de 5 mL cada una, para los ensayos de Sudan, Baljet, y Liebermann-Burchard, Dragendorff, Mayer y Wagner. (Miranda, M. 2006)

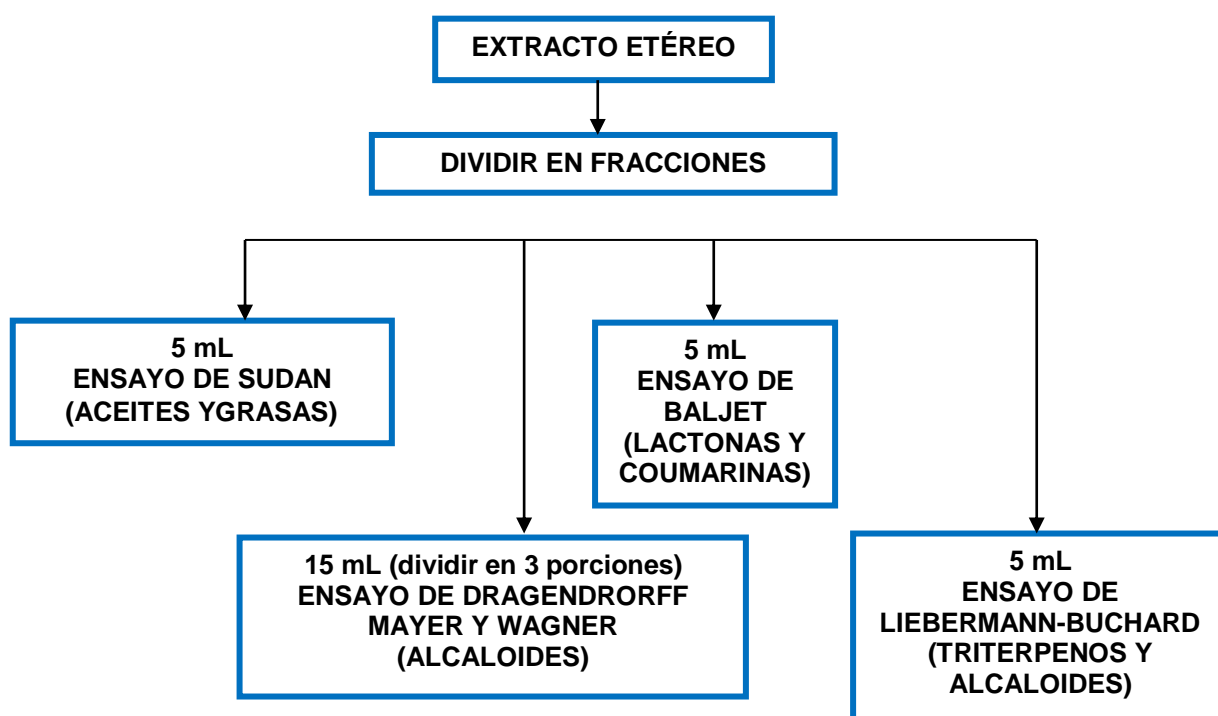


FIGURA No. 2 ESQUEMA DE LAS REACCIONES A REALIZAR EN EL EXTRACTO DE ÉTER DIETÍLICO. (MIRANDA, M. 2006)

Una vez obtenido el extracto alcohólico, fue dividido en 13 fracciones, una de 1 mL para el ensayo de catequinas, las otras 10 fracciones, con un volumen de 2 mL cada una, para ensayo de: resinas, Fehling, Baljet, Liebermann-Burchard, espuma, cloruro férrico, ninhidrina, Borntrager, Shinoda, Kedde, y antocianidinas; y finalmente la última fracción se volvió a dividir en 3 porciones con un volumen de 2 mL cada una para los ensayos de Dragendorff, Mayer y Wagner. (Miranda, M. 2006)

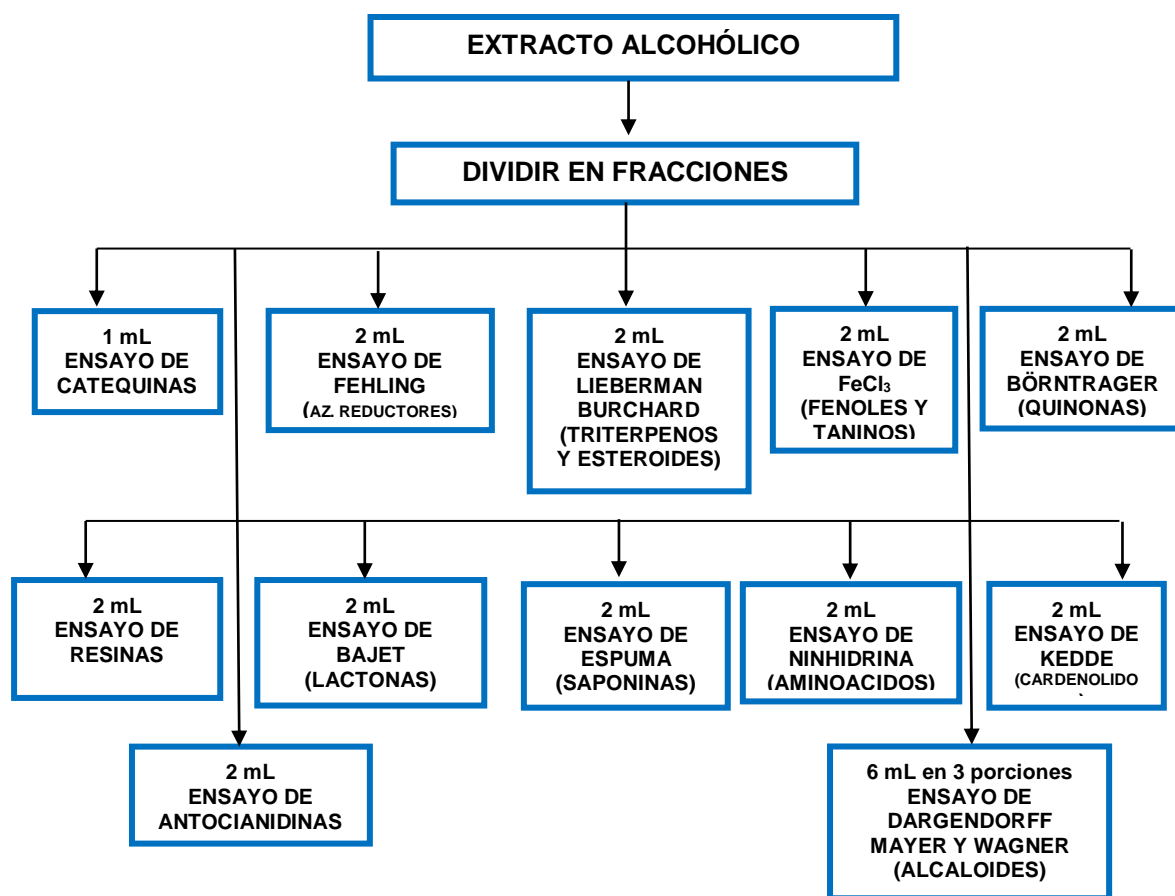


FIGURA No. 3

ESQUEMA DE LAS REACCIONES A REALIZAR EN EL EXTRACTO ALCOHÓLICO. (MIRANDA, M. 2006)

El extracto acuoso fue dividido en fracciones, una con 6 mL, en la cual se ocupó un volumen de 2 mL para los ensayos de Dragendorff, Mayer y Wagner, además de fracciones de 2 mL para los ensayo de: cloruro férrico, Shinoda, Fehling y espuma, 1 ó 2 gotas para el ensayo de principios amargos y 10 mL para el ensayo de mucílagos. (Miranda, M. 2006)

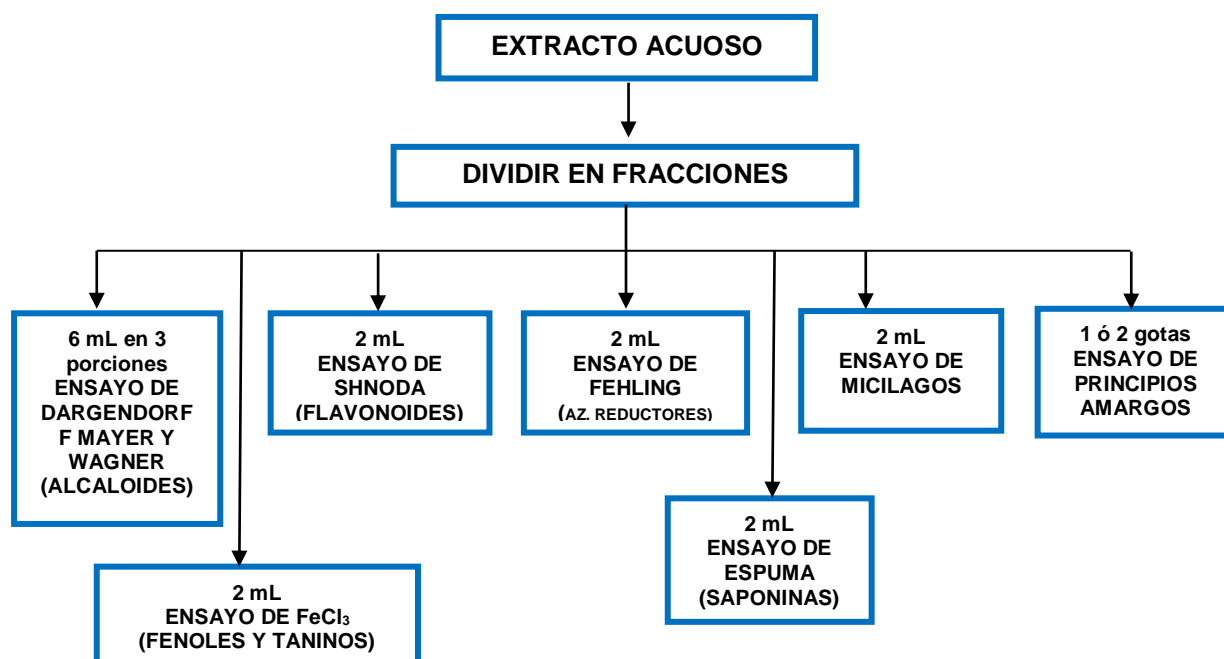


FIGURA No. 4 ESQUEMA DE LAS REACCIONES A REALIZAR EN EL EXTRACTO ACUOSO.

2.3.3.2 Descripción de los métodos

2.3.3.2.1 ENSAYO DE SUDÁN

Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos grasos, para ello, a la alícuota de la fracción en el solvente de extracción, se le añade 1 mL de una solución diluida en agua del colorante Sudan III o Sudan IV. Se calienta en baño de agua hasta evaporación del solvente. La presencia de compuestos grasos se considera positiva si aparecen gotas o una película coloreada de rojo en el seno del líquido o en las paredes del tubo de ensayos respectivamente. (Miranda, M. y Muñoz, J. 2006)

2.3.3.2.2 ENSAYO DE BALJET

Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular coumarinas, aunque otros compuestos lactónicos pueden dar positivo al ensayo. Para ello, si la alícuota del extracto se encuentra en alcohol, debe

evaporarse el solvente en baño de agua y redisolverse en la menor cantidad de alcohol (1 mL). En estas condiciones se adiciona 1 mL de reactivo, considerándose un ensayo positivo la aparición de una coloración o precipitado rojo (++) y (+++) respectivamente. (Miranda, M. y Muñoz, J. 2006)

2.3.3.2.3 ENSAYO DE LIEBERMANN-BURCHARD

Permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroides, por ambos tipos de productos poseer un núcleo del androstano, generalmente insaturado en el anillo 8 y la posición 5-6. (Miranda, M. y Muñoz, J. 2006)

Se adiciona 1 mL de anhídrido acético y se mezcla bien. Por la pared del tubo de ensayo se dejan resbalar 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. Un ensayo positivo se tiene por un cambio rápido de coloración. (Miranda, M. y Muñoz, J. 2006)

1. Rosado – azul muy rápido
2. Verde intenso – visible aunque rápido
3. Verde oscuro – negro – final de la reacción

A veces el ensayo queda en dos fases o desarrollo de color, Muy pocas veces puede observarse el primer cambio. El tercer cambio generalmente ocurre cuando el material evaluado tiene cantidades importantes de estos compuestos. (Miranda, M. y Muñoz, J. 2006)

2.3.3.2.4 ENSAYO DE DRAGENDORFF

Permite reconocer en un extracto la presencia de alcaloides, para ello, si la alícuota del extracto está disuelta en un solvente orgánico, éste debe evaporarse, en un baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de ácido clorhídrico al 1 % en agua. Si el extracto es acuoso, a la alícuota se le añade 1 gota de ácido clorhídrico concentrado, (calentar suavemente y dejar enfriar hasta acidez). Con la solución acuosa ácida se realiza el ensayo, añadiendo 3 gotas del reactivo de Dragendorff si hay opalescencia se considera (+) turbidez definida (++) , precipitado (+++). (Miranda, M. y Muñoz, J. 2006)

2.3.3.2.5 ENSAYO DE MAYER

Se debe proceder de igual manera que en el ensayo de Dragendorff, hasta obtener solución ácida. Luego añada una pizca de cloruro de sodio en polvo, agite y filtre. Añada de 2 a 3 gotas de la solución reactiva de Mayer, si hay opalescencia se considera (+) turbidez definida (++), precipitado coposo (+++). (Miranda, M. y Muñoz, J. 2006)

2.3.3.2.6 ENSAYO DE WAGNER

Se parte de igual manera en los casos anteriores de la solución ácida, añadiendo 2 ó 3 gotas del reactivo, clasificando los resultados de la misma forma. (Miranda, M. y Muñoz, J. 2006)

2.3.3.2.7 ENSAYO DE RESINAS

Para detectar este tipo de compuestos, adicione a 2 mL de la solución alcohólica, 10 mL de agua destilada. La aparición de un precipitado, indica un ensayo positivo. (Miranda, M. y Muñoz, J. 2006)

2.3.3.2.8 ENSAYO DE FEHLING

Permite conocer en un extracto la presencia de azúcares reductores. Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en agua, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 – 2 mL de agua. Se adicionan 2 mL del reactivo y se calienta en baño de agua 5 – 10 min la mezcla. El ensayo se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece precipitado rojo. (Miranda, M. y Muñoz, J. 2006)

2.3.3.2.9 ENSAYO ESPUMA

Permite reconocer en un extracto la presencia de saponinas, tanto del tipo esferoidal como triterpénica. De modo que si la alícuota se encuentra en alcohol, se diluye con 5 veces su volumen en agua y se agita la mezcla fuertemente durante 5 – 10 min.

El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y persiste por más de 2 minutos. (Miranda, M. y Muñoz, J. 2006)

2.3.3.2.10 ENSAYO CLORURO FÉRRICO

Permite determinar la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos en un extracto vegetal. Si el extracto de la planta se realiza con alcohol, el ensayo determina tanto fenoles como taninos. A una alícuota del extracto alcohólico le adicionan 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica. Si el extracto es acuoso se añade acetato de sodio para neutralizar y tres gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica, un ensayo positivo puede dar la siguiente información general. (Miranda, M. y Muñoz, J. 2006)

- Desarrollo de una coloración rojo – vino, compuestos fenólicos en general
- Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo Pirocatecolicos.
- Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalotánicos. (Miranda, M. y Muñoz, J. 2006)

2.3.3.2.11 ENSAYO DE NINHIDRINA

Permite reconocer en los extractos vegetales la presencia de aminoácidos libres o de aminas en general. Se toma una alícuota del extracto en alcohol, o el residuo de la concentración en baño de agua, si el extracto se encuentra en otro solvente orgánico, se mezcla con 2 mL de solución al 2% de ninhidrina en agua. La mezcla se calienta 5 – 10 minutos en baño de agua. Este ensayo se considera positivo cuando se desarrolla un color azul violáceo. (Miranda, M. y Muñoz, J. 2006)

2.3.3.2.12 ENSAYO DE BORNTRAGER

Permite reconocer en un extracto la presencia de quinonas. Para ello si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo.

Se adiciona 1 mL hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amonio al 5% en agua. Se agita mezclando las fases y se deja en reposo hasta su ulterior separación.

Si la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado o rojo, el ensayo se considera positivo. Coloración rosada (++), coloración roja (+++). (Miranda, M. y Muñoz, J. 2006)

2.3.3.2.13 ENSAYO DE SHINODA

Permite reconocer la presencia de flavonoides en el extracto de un vegetal. Si la alícuota del extracto se encuentra en alcohol, se diluye con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se espera 5 minutos, se añade 1 mL de alcohol amílico, se mezclan las fases y se deja reposar hasta que se separen. Si la alícuota del extracto se encuentra en agua, se procede de igual forma, a partir de la adición del ácido clorhídrico concentrado. (Miranda, M. y Muñoz, J. 2006)

El ensayo se considera positivo, cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo; intenso en todos los casos. (Miranda, M. y Muñoz, J. 2006)

2.3.3.2.14 ENSAYO DE KEDDE

Permite reconocer en un extracto la presencia de glicósidos cardiotónicos. Una alícuota del extracto en etanol se mezcla con 1 mL del reactivo y se deja reposar durante 5 a 10 minutos. Un ensayo positivo es en el que se desarrolla una coloración violácea persistente durante 1 a 2 horas. (Miranda, M. 2006)

2.3.3.2.15 ENSAYO DE ANTOCIANIDINAS

Permite reconocer en los extractos vegetales la presencia de estas estructuras de secuencia C6-C3-C6 del grupo de los flavonoides. Se calientan 2 mL del extracto etanólico 10 minutos con 1 mL de HCl concentrado. Se deja enfriar y se adiciona 1 mL de agua y 2 mL de alcohol amílico. Se agita y se deja separar las dos fases. La aparición de color rojo a marrón en la fase amílica, es indicativa de un ensayo positivo. (Miranda, M. 2006)

2.3.3.2.16 ENSAYO DE MUCÍLAGOS

Permite reconocer en los extractos de vegetales la presencia de esta estructura tipo polisacárido, que forma un coloide hidrófilo de alto índice de masa que aumenta la densidad del agua donde se extrae. Para ello una alícuota del extracto en agua se enfría a

0 - 5 °C y si la solución toma una consistencia gelatinosa el ensayo es positivo. (Miranda, M. 2006)

2.3.3.2.17 ENSAYO DE CATEQUINAS

Para ello, tome de la solución alcohólica obtenida una gota, con la ayuda de un capilar y aplique la solución sobre papel filtro. Sobre la mancha aplique solución de carbonato de sodio. La aparición de una mancha verde carmelita a la luz UV, indica un ensayo positivo. (Miranda, M. 2006)

2.3.3.2.18 ENSAYO DE PRINCIPIOS AMARGOS

El ensayo se realiza saboreando 1 gota del extracto acuoso o del vegetal reconociendo el sabor de cada uno de los principios, bien diferenciado por el paladar. (Miranda, M. y Muñoz, J. 2006)

2.3.4 PRUEBAS DE SOLUBILIDAD

Estas pruebas se realizaron con etanol, agua y metanol, con el fin de establecer con cuál de estos compuestos se solubiliza de mejor manera y así, establecer qué solvente se usará para obtener los extractos y realizar las pruebas correspondientes.

Se colocó una mezcla de látex y solvente (etanol, agua o metanol) en relación (1:1) es decir 15 mL de látex y 15 mL de solvente, se agitó vigorosamente y se observó los resultados.

2.3.5 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO PURIFICADO DE ALCALOIDE BRUTO

2.3.4.1 MÉTODO No. 1

En primera instancia, tanto para pruebas preliminares como para obtención del extracto, se estableció un método de extracción de alcaloides, esquematizado en la figura No. 5, tal y como se observa a continuación. En este, se utilizó agua acidulada H_2SO_4 (2%)

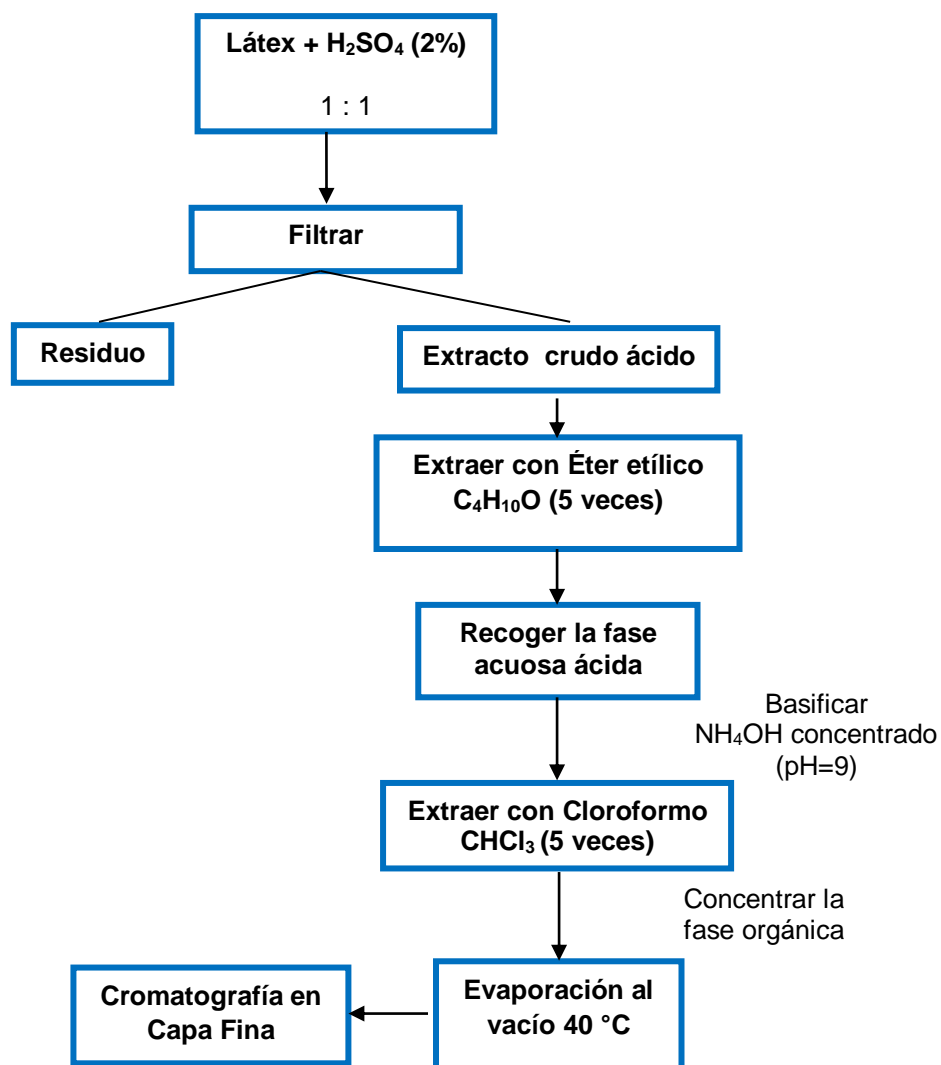


FIGURA No. 5 **MÉTODO No.1 PARA LA OBTENCIÓN DEL EXTRACTO PURIFICADO DE ALCALOIDES DE *Brosimum utile***

Se mezcló el látex con agua acidulada H₂SO₄ (2%) en relación (1:1); por lo tanto se mezclaron 100 mL de látex con 100 mL de H₂SO₄ (2%), se procedió a filtrar al vacío y se obtuvo un filtrado de características adecuadas, coloración semitransparente sin residuos.

A continuación en el filtrado crudo ácido se añadió 50 mL de éter etílico (C₄H₁₀O) en un embudo de decantación y se agito vigorosamente por 10 minutos, para conseguir

separarla fase orgánica de la acuosa, recolectando la fase acuosa, este procedimiento se los realizó 5 veces, con el fin de ir eliminando todas las impurezas.

Posteriormente se procedió a basificar la fase acuosa añadiendo NH_4OH concentrado hasta llegar a $\text{pH}=9$ con ayuda del potenciómetro HannaMicroprocessor pH meter® 211, ya que este pH es el más óptimo, luego de haber realizado pruebas preliminares a pH 8, 9 y 10.

En esta solución alcalina se colocó 50 mL de cloroformo CHCl_3 con el propósito de separar la fase orgánica de la fase acuosa, recolectando la fase orgánica, la cual contiene los alcaloides. Este proceso se realizó por 5 veces con el fin de obtener un extracto alcaloide lo más puro posible. También se le añadió goma arábica y sodio sulfato anhidro con el fin de eliminar residuos de agua.

Posteriormente se llevó al vacío con ayuda de un evaporador rotativo a una temperatura de 40°C siendo esta la temperatura de ebullición del cloroformo. Finalmente almacenamos en un envase de menor tamaño, añadiendo un volumen de 10 mL de cloroformo para reconstituir y ser utilizado durante las cromatografías o pruebas *in vivo*.

2.3.4.2 MÉTODO No. 2

Posteriormente, por motivo de agotamiento de materia prima, se obtuvo látex de un árbol no tan maduro respecto al anterior, el mismo que tenía diferentes características ligeramente diferentes, de manera que se estableció un nuevo protocolo de extracción de alcaloides, el cual se puede encontrar en la figura No.6, en el cual se mezcla en primera instancia con metanol, y se purifica con cloroformo (CHCl_3). Es decir con este método se obtuvo el extracto final puro de alcaloides, utilizado para las cromatografías.

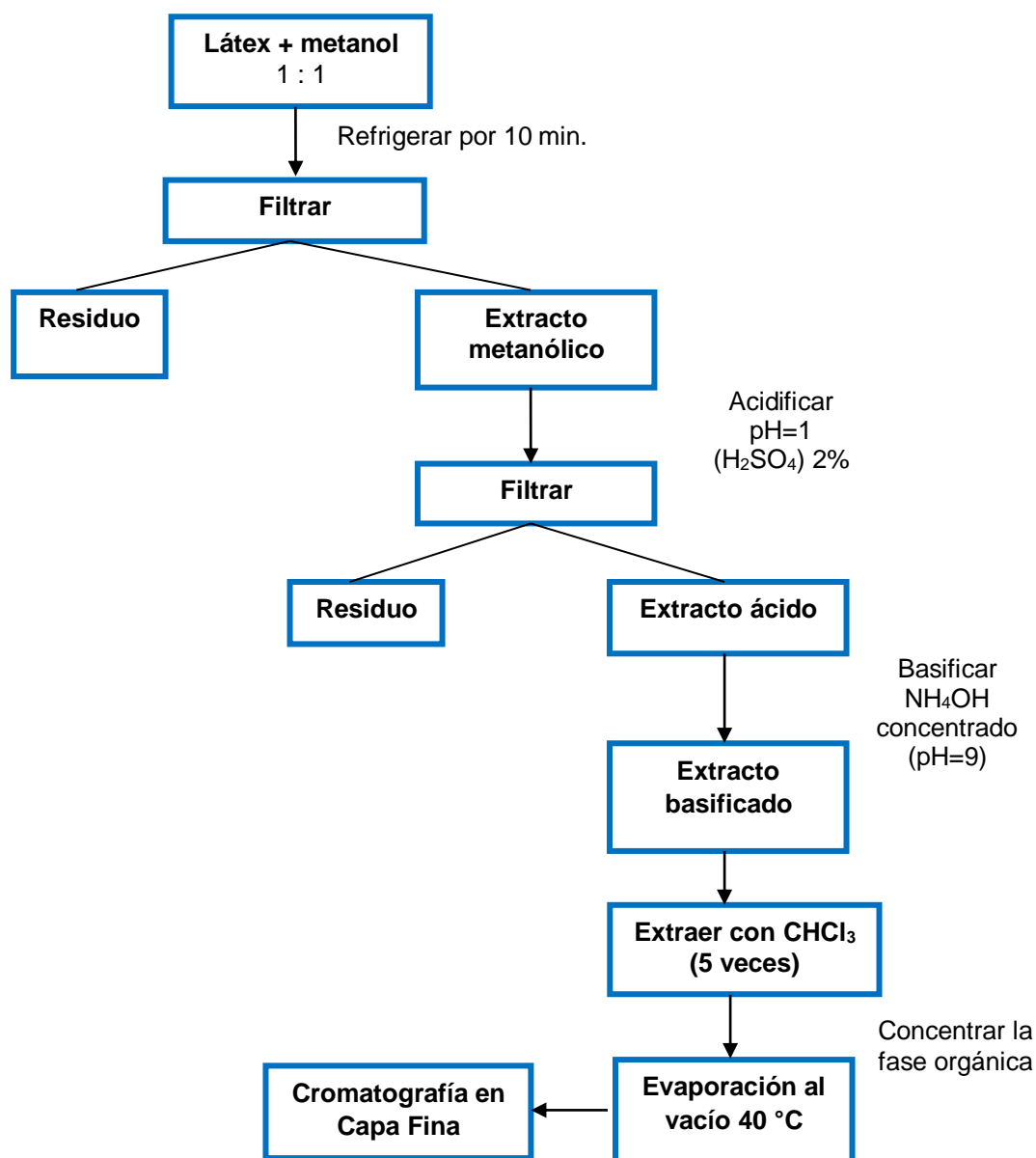


FIGURA No. 6 **MÉTODO No.2 PARA LA OBTENCIÓN DEL EXTRACTO PURIFICADO DE ALCALOIDES DE *Brosimum utile***

Para este procedimiento se mezcló en primera instancia el látex con el metanol en relación (1:1); es decir, se mezclaron 100 mL de látex con 100 mL de metanol, y se refrigeraron por 10 minutos, con el fin de estabilizar la muestra y obtener un filtrado de características esperadas, es decir de coloración semitransparente.

A continuación, se procedió a filtrar al vacío, en este paso se debe cambiar de papel filtro constantemente ya que se satura rápidamente, luego se recogió el filtrado dando un volumen de 50 mL aproximadamente, el cual fue el primer filtrado metanólico. Éste fue acidificado con H_2SO_4 al 2 %, hasta llegar a pH de 1 con ayuda del potenciómetro y se realizó un filtrado de esta mezcla. Este segundo filtrado ácido se recogió, el mismo que fue basificado con NH_4OH concentrado, hasta obtener un pH de 9.

El tercer filtrado basificado se mezcló con cloroformo CHCl_3 , ya que este solvente de polaridad media dio características adecuadas de purificación y separación de las dos fases, luego de haber utilizado como segunda opción al acetato de etilo $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ el cual no brindó las características de separación esperadas.

Una vez, mezclado el filtrado basificado con 50 mL de cloroformo CHCl_3 , se colocó en un embudo de decantación para ser agitado de forma vigorosa por 10 minutos, con el propósito de separar la fase orgánica de la fase acuosa, recogiendo la fase orgánica, que contenía los alcaloides. Este procedimiento de purificación se realizó 5 veces, con el fin de eliminar todos los compuestos que pueden interferir en el análisis y que no son de interés.

Además, se le agregó goma arábiga y sulfato de sodio anhidro, para atrapar las pequeñas impurezas presentes y los restos de agua, y así conseguir que el extracto sea lo más puro posible.

Una vez obtenido este extracto, se colocó en un balón de corazón (previamente tarado) y se procedió a concentrar en el evaporador rotativo, a presión reducida, a la temperatura de ebullición del cloroformo (40°C).

Finalmente, se dejó al balón en el desecador, se pesó al siguiente día y se obtuvo el rendimiento. Posteriormente, se le agregó un pequeño volumen de metanol anhidro (10 mL) para redissolver el extracto puro y conservarlo para posteriores usos. Por último, con este extracto purificado de alcaloides se realizó la cromatografía de capa fina (CCF) para comprobar la presencia de los alcaloides de interés.

2.3.5.1 Rendimiento de extracción de alcaloides

Para obtener el rendimiento de extracción se pesó previamente el balón de corazón en el que se iba a colocar el extracto puro de alcaloides, luego dejó secar en la estufa a 105°C durante 8 horas y se volvió a pesar y así sucesivamente hasta obtener un peso constante, es decir un peso de balón tarado, conocido como peso de balón vacío (peso 1)

Luego de haber concentrado el extracto puro de alcaloides en el rotavapor y haberlo dejado secar en el desecador, se pesó el balón y se obtuvo el peso conocido como balón+extracto (peso 2).

2.3.5.1.1 Ecuación para obtener el rendimiento del extracto total

Se obtuvo por diferencia el peso del extracto total conocido como rendimiento como se explica en la ecuación siguiente.

$$\text{EXTRACTO TOTAL} = \text{BALÓN + EXTRACTO (peso 2)} - \text{BALÓN VACIO (peso 1)}$$

2.3.6 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (CCF)

2.3.6.2 Ensayos en Cromatografía en Capa Fina empleados

Estudios realizados en el látex de la especie *Brosimum rubescens*, conocida como pali sangre, establecen la presencia de alcaloides de tipo indólico, destacando el alcaloide bufotenina. Para confirmar si el látex de la especie *Brosimum utile*, del presente estudio, presenta este alcaloide o similares, se realizó una cromatografía de capa fina (CCF). (Murray, R. 1992)

Para esto se utilizó papel cromatográfico que contiene gel de sílice (SiO₂). Se pulverizó la placa con KOH 0.1M, se dejó secar y luego se sembró inyectando 25 µL del extracto puro de alcaloides. A continuación, se colocó en la cuba de vidrio, la misma que contenía la fase móvil de metanol más amoníaco concentrado en relación (100:0.15). Una vez que el solvente recorrió tres cuartas partes del soporte, se dejó secar y se procedió a la revelación de la placa. (Moffat, A. 2011)

Seguidamente, se pulverizó con el revelador Dragendorff, se dejó secar y luego se llevó a un gabinete de visualización UV para placas cromatográficas, el cual permite la visualización de los compuestos bajo la luz ultravioleta (254 nm). Posteriormente, se pulverizó la placa de TLC con un revelador consistente en NaNO_2 10%, tratamiento que induce una intensificación del color de las manchas correspondientes a compuestos alcaloides. (Moffat, A. 2011)

2.3.7 DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS Y FÍSICAS DEL EXTRACTO ALCALOIDEO

2.3.7.1 COLOR

Se colocó en un tubo de ensayo un poco del extracto alcaloideo, y se observó el color a tras luz.

2.3.7.2 OLOR

Se introdujo un pedazo de papel absorbente en el extracto alcaloideo, se dejó secar y se procedió a determinar con el olfato las características del producto.

2.3.7.3 ASPECTO

Éste se determinó observando la transparencia de la muestra.

2.3.7.4 ÍNDICE DE REFRACCIÓN

Una vez limpia la zona del prisma, se colocó una gota del extracto alcaloideo sobre la zona de medición, se cerró y se procedió a observar sobre la línea límite de los campos claro y oscuro.

2.3.7.5 pH

Se procedió a colocar en un vaso y con la ayuda del potenciómetro se midió el valor del pH.

2.3.8 PRUEBAS ANTIMICROBIANAS *IN VITRO*

2.3.8.1 ESTERILIZACIÓN DE MATERIALES

Se realizó la esterilización del material, colocando en fundas de tela etiquetadas y clasificándoles en vidrio, plástico, puntas, hisopos, etc. para llevar a autoclave a 125°C por 35 minutos. Una vez esterilizado el material, se colocó en una estufa y se guardó hasta el momento de uso. (Mims, C. et al. 1999)

2.3.9 REACTIVACIÓN DE CEPAS ATCC (American Type Culture Collection)

2.3.9.1 PREPARACIÓN DE CALDO DE CULTIVO SOYA TRIPTICASA (TSB)

Se prepararon en un matraz Erlenmeyer 100 mL de caldo Soya Tripticasa y se llevó a ebullición. Luego, se colocó en un esterilizador de vapor a 121°C a 15 psi de 30 a 35 minutos. Finalmente, se dispensó en tubos 5 mL el caldo TSB y se añadieron las Cepas ATCC. (Mims, C. et al. 1999)

2.3.9.2 SUSPENSIÓN DE MICROORGANISMOS ATCC

Se clasificaron e identificaron las cepas ATCC que fueron reactivadas y con ayuda de un hisopo, el cual fue introducido previamente en el caldo de sembrado (TSB), se tomaron las cepas, que posteriormente iban a ser sembradas, y se sumergieron en un ángulo de 45° en cada tubo codificado que contenía el caldo TSB y se dejó incubar a 35°C de 18-24 horas. (Mims, C. et al. 1999)

Las cepas que se utilizaron fueron:

Trichophyton rubrum ATCC 1825

Epidermophyton floccosum ATCC 3562

Candida albicans ATCC 2533

Staphylococcus aureus ATCC 1025

Escherichia coli ATCC 3522

Klebsiella pneumoniae ATCC 1224

Pseudomonas aeruginosa ATCC 1652

2.3.9.3 SIEMBRA DE MICROORGANISMOS ATCC

Una vez que se ha verificado la turbidez en los tubos codificados, se procedió a sembrar en placas de Petri (monopetri) con el asa estéril en forma de estría con la técnica de los 3 cuadrantes, en el respectivo agar para cada tipo de microorganismos como se indica a continuación. (Mims, C. et al. 1999)

1. En el caso de los hongos *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum* y *Cándida albicans* se sembró en agar Sabouraud + cloranfenicol y se dejó incubar a temperatura ambiente de 5 a 7 días. (Mims, C. et al. 1999)
2. En el caso de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* se sembró con el asa estéril en agar Manitol Salado y se dejó incubar a 35°C de 18 a 24 horas.
3. En el caso de *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* se sembró igual que en el anterior caso, pero sobre agar MacConkey y se dejó incubar a 35°C de 18 a 24 horas.

2.3.9.4 ALMACENAMIENTO DE CEPAS ATCC REACTIVADAS

Una vez que las colonias estaban reactivadas, se almacenaron en tubos *slam* o pico de flauta los mismos que contenían agar Soya Trypticase como medio nutritivo y se sembró en forma de estría con la aguja de platino. Por último, se procedió a sellar los tubos para evitar la contaminación. (Mims, C. et al. 1999)

2.3.10 METODOLOGÍA PARA EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

2.3.11.1 Difusión en Agar con Disco

Se inoculó el hongo en la superficie del agar y luego se depositó un disco de papel, con una concentración conocida de extracto, para luego ser incubada. Dependiendo del tamaño de la zona de inhibición del hongo alrededor del disco, se determinó si el hongo era sensible, resistente, intermedio o indeterminado. (Fernández, B. 2005)

El tamaño de la zona de inhibición se midió para determinar si el microorganismo inhibido es sensible o resistente (prueba de susceptibilidad) (Fernández, B. 2005)

Para poder realizar estas pruebas fue necesario que los antimicrobianos fuesen capaces de difundir de forma adecuada a través del agar. Entre las ventajas de este método se encuentra que la tasa de difusión de cada antifúngico en el agar es generalmente predecible y reproducible. (Fernández, B. 2005)

2.3.11.1.1 Procedimiento

Se tomaron las cajas de Petri que contenían como medio agar Sabouraud + cloranfenicol, y rotulamos respectivamente. (Bedout, C. et al. 2003)

Posteriormente, se prepararon los discos de inhibición que fueron colocados posteriormente sobre las placas de Petri sembradas. Estos discos se encontraban empapados con diferentes concentraciones del extracto, además de un blanco y un control positivo. (Bedout, C. et al. 2003)

Se tomaron las cajas de Petri de agar Sabouraud y se procedió a estriar el hongo con un hisopo estéril con la técnica de los 3 cuadrantes. Se colocaron los discos de inhibición ya preparados anteriormente a diferentes concentraciones. (Bedout, C. et al. 2003)

Transcurridos 30 minutos se dejaron incubar las placas a temperatura ambiente por un periodo de 5 a 7 días. (Díaz, L. et al. 2011)(Bedout, C. et al. 2003). Transcurrido este tiempo se observó si existía actividad del extracto.

2.3.11 METODOLOGÍA PARA EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

2.3.11.1 Método de Mitscher

La actividad antimicrobiana se cuantifica *in vitro* para determinar la susceptibilidad o la resistencia de un microorganismo determinado a diferentes concentraciones de un extracto. (Berrios, V. 2001)

El método consistió en colocar diferentes concentraciones del extracto en cajas de Petri conteniendo agar Mueller Hinton, en las cuales se procedió a marcar con una línea el sitio donde serán sembrados cada uno de los microorganismos de prueba y luego con un asa de Henle estéril se tomó una asada de la suspensión de cada microorganismo en turno. El asa con el microorganismo entonces fue rayada en un patrón radial de cada caja de Petri siguiendo la plantilla. Una vez inoculada, se incubaron y luego se examinaron cada una de las placas de Petri y se determinó si hubo o no actividad antimicrobiana por la presencia o no de colonias. (Berrios, V. 2001)

2.3.11.1.1 PREPARACIÓN DE LAS PLACAS

1. Se preparó el agar Mueller Hinton (MH), pesando la cantidad necesaria y disolviéndolo con agua destilada, luego se llevó a ebullición y se autoclavó a 121°C, 15 psi de 30-35 minutos. Se dejó enfriar por unos 10 minutos hasta que llegue a los 35°C.
2. Se colocó en las cajas de Petri el extracto puro de alcaloides y encima se agregó 20 mL de agar Mueller Hinton aproximadamente, hasta obtener un espesor de 4 mm. El extracto puro de alcaloides metanólico se aplicó en volúmenes de 100 uL y 1 mL, se dejó secar y se procedió a sembrar. A continuación, se siguió sembrado placas con diluciones del extracto de alcaloides de 100, 250, 500, 750 y 1000 uL, y así sucesivamente hasta encontrar la concentración exacta en la que inhibe y no inhibe.

3. También se realizó un blanco, es decir una caja de Petri que contenía solo agar Mueller Hinton y un control positivo, una caja de Petri que contenía 1 mL del solvente del extracto (metanol) más el agar Mueller Hinton. (Mims, C. et al. 1999)

2.3.11.1.2 ESTRIADO DE MICROORGANISMOS

Antes de sembrar en las placas de Petri, se realizó una dilución de microorganismos a partir de la solución madre y que cumplía la Escala 0.5 Macfarland de 1.5×10^8 g/mL, observando la turbidez. A partir de esta dilución, se procedió a sembrar los microorganismos en las placas ya preparadas anteriormente. (Mims, C. et al. 1999)

Con un asa de platino esterilizada y enfriada entre cada estriado, se tomó una asada de cada microorganismo y se procedió a estriar siguiendo un patrón radial en cada caja de Petri desde el centro hacia el borde sin topar las paredes, tal y como se muestra en la plantilla del gráfico N° 2. (Mims, C. et al. 1999)

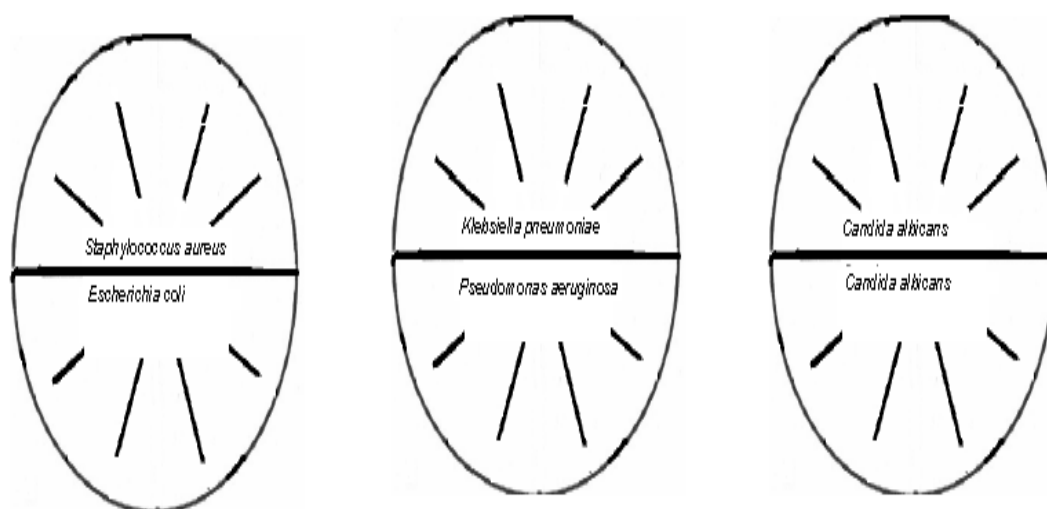


GRAFICO N° 2. MODELO DE INOCULACIÓN POR EL MÉTODO DE MITSCHER.
(Mims, C. et al. 1999)

Luego que todas las cajas de Petri estaban sembradas y rotuladas respectivamente para cada microorganismo, se invirtieron y se incubaron a 35 °C, para evitar que el agua condensada caiga sobre el agar y altere el crecimiento bacteriano. (Mims, C. et al. 1999)

Por último, se procedió a observar el crecimiento e inhibición dentro del tiempo establecido para los microorganismos sembrados que es de 18 a 24 horas. Para el reporte de resultados se clasificó a este estudio en tres parámetros de lectura:

A = Activo (No existe crecimiento)

P= Parcialmente Activo (poco crecimiento)

I= Inactivo (existe crecimiento) (Mims, C. et al. 1999)

2.3.12 Concentración Mínima Inhibitoria (CIM).

La concentración mínima inhibitoria es la actividad que muestra el extracto puesto a prueba en el laboratorio y se expresa como la concentración más baja a la cual el extracto inhibe la multiplicación de microorganismos, la cual se expresa como CIM. (Berrios, V. 2001)

CAPITULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DEL LÁTEX

CUADRO No. 4 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS Y FISICOQUÍMICAS DE LÁTEX PURO DE *Brosimum utile*. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. OCTUBRE 2014

PROPIEDADES	CARACTERÍSTICAS
Color	Crema
Textura	Pegajosa
Aspecto	Grumoso
Olor	Ligeramente ácido
Sabor	Desagradable, picante
pH	4.25 ligeramente ácido

3.1 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

Se realizó el presente estudio con el fin de determinar los metabolitos secundarios presentes en la especie *Brosimum utile* y así se identificaron los diferentes grupos químicos presentes.

CUADRO No. 5 TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ETÉREO DE *Brosimum utile*. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. OCTUBRE 2014

ENSAYO	EXTRACTO ETÉREO
	<i>Látex</i>
Sudan	(+)
Dragendorff	(-)
Wagner	(-)
Mayer	(+)
Lieberman-Buchard	(++)
Baljet	(-)

INTERPRETACIÓN DE LA TABLA: (-) AUSENCIA DEL METABOLITO, (+) BAJA EVIDENCIA, (++) EVIDENCIA, (+++) ALTA EVIDENCIA.

El tamizaje fitoquímico en el extracto etéreo, mostró resultados positivos en Lieberman-Buchard y Sudan lo que indicó la presencia de triterpenos y esteroides, los mismos que poseen una amplia actividad antimicobacteriana frente a agentes patógenos. (Roig, J. 1998) También se determinó la presencia de grasas y aceites, respectivamente, metabolitos presentes en las plantas como medio de defensa frente a agentes antimicóticos, insectos, herbívoros entre otros. (Roig, J. 1998) Además, el resultado positivo para Mayer indica el primer indicio de la presencia de alcaloides, los mismos que poseen actividad alucinógena, antibacteriana y antimicótica. (Roig, J. 1998)

CUADRO No. 6 TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE *Brosimum utile*. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. OCTUBRE 2014

ENSAYO	EXTRACTO ALCOHÓLICO
	<i>Látex</i>
Catequinas	(-)
Resinas	(+++)
Fehling	(-)
Baljet	(-)

Libermann-Buchard	(-)
FeCl₃	(-)
Saponinas	(+)
Bontrager	(-)
Shinoda	(-)
Hidroxamato férrico	(-)
Dragendorff	(-)
Mayer	(-)
Wagner	(-)

INTERPRETACIÓN DE LA TABLA: (-) AUSENCIA DEL METABOLITO, (+) BAJA EVIDENCIA, (++) EVIDENCIA, (+++) ALTA EVIDENCIA.

En el extracto alcohólico, se puede notar que da positivo para resinas, lo que indica la presencia de una gran cantidad de gomas y resinas en el látex, lo cual se puede apreciar en el carácter viscoso que presenta el látex al tacto, lo que es característico de esta parte de la planta. Además la formación de gran cantidad de espuma, la misma que fue persistente por más de 2 minutos, muestra como positiva la presencia de saponinas, las mismas que tienen un amplio rango de actividades biológica por su acción antiviral, antimicótica, antiinflamatoria, hipolesterolémica.(Martínez, Y.)

CUADRO No. 7 TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Brosimum utile*. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. OCTUBRE 2014

PRUEBA	EXTRACTO ACUOSO
	<i>Látex</i>
Dragendorff	(+)
Wagner	(+)
Mayer	(+)
Fe Cl₃	(-)
Shinoda	(-)
Fehling	(-)
Baljet	(-)
Borntrager	(-)
Libermann-Burchard	(-)
Resinas	(+)
Mucilagos	(-)
Principios amargos	(+)

INTERPRETACIÓN DE LA TABLA: (-) AUSENCIA DEL METABOLITO, (+) BAJA EVIDENCIA, (++) EVIDENCIA, (+++) ALTA EVIDENCIA.

En el extracto acuoso se observó la presencia de resinas, que son las que más interfieren y enmascaran a los otros compuestos, durante la purificación y aislamiento de algún metabolito secundario. Además se evidenció positivamente la presencia de alcaloides, dando positivo en los ensayos de Dragendorff, Mayer y Wagner, los cuales son de nuestro interés por su actividad antimicrobiana y antimicótica.

La presencia mayoritaria de alcaloides en el extracto acuoso indicó que estos se encuentran en forma de sal, lo cual fue tomado muy en cuenta para el uso adecuado de los solventes al momento del aislamiento y extracción de los alcaloides puros.

3.2 PRUEBAS DE SOLUBILIDAD

**CUADRO No. 8 PRUEBAS DE SOLUBILIDAD CON EL LÁTEX DE *Brosimum utile*.
LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE
CIENCIAS. ESPOCH. OCTUBRE 2014**

MUESTRA	SOLVENTE	RESULTADO
Látex	Etanol	Medio
Látex	Agua	Bajo
Látex	Metanol	Óptimo

Como se puede observar en el cuadro No. 8, la mezcla de látex con agua no fue muy buena ya que se formaron pequeños grumos y se separó en dos fases, sin embargo al momento de la filtración se obtiene un filtrado de buenas características.

La mezcla del látex con etanol fue mejor ya que no se formaron grumos, pero al momento de la filtración hubo problemas ya que se saturó el papel y el rendimiento de filtrado era bajo.

La mezcla del látex con metanol fue la más óptima, ya que no se formaron grumos, se homogenizó uniformemente y al momento de la filtración, no se saturó el papel; la filtración fue más rápida y se obtuvo mayor cantidad de filtrado semitransparente.

Estos resultados de solubilidad, indicaron que tanto las mezclas de látex con agua como con metanol permitían la obtención de buenos filtrados. Por ello, se emplearán estas dos mezclas para obtener los extractos necesarios de alcaloides.

3.3 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO PURO DE ALCALOIDES

Para la obtención del extracto puro de alcaloides, durante pruebas preliminares, se utilizó el primer método de extracción empleando agua acidulada H_2SO_4 2% (ver Figura No. 6), dando como resultado una buena extracción pero de bajo rendimiento.

Por motivo de agotamiento de materia prima, se logró obtener un látex de árbol no muy maduro, de forma que la extracción de alcaloides resultó desfavorable; al mezclar con agua acidulada, el primer filtrado era un líquido muy turbio, de pésimas características.

Por ello, se utilizó el segundo método de extracción (ver Figura No. 7), en el cual se mezcla con metanol, y se purificó con cloroformo (CHCl_3). Así, se logró obtener un extracto de alcaloides puro; sin embargo el rendimiento no fue tan alto, debido a que el látex se encontraba con demasiadas impurezas, gran cantidad de resinas y gomas, las mismas que interfirieron al momento de realizar las sucesivas limpiezas con los solventes.

3.3.1 RENDIMIENTOS

3.3.1.1 MÉTODO No. 1

Balón vacío: 103.323 g

Balón + extracto: 103.341 g

$$\text{EXTRACTO TOTAL} = \text{BALÓN + EXTRACTO (peso 2)} - \text{BALÓN VACIO (peso 1)}$$

$$\text{EXTRACTO TOTAL} = 103.341 \text{ g} - 103.323 \text{ g}$$

$$\text{EXTRACTOTOTAL} = 0.018\text{g} = 18\text{mg}$$

Esto indica que por cada 100 mL de látex se puede obtener 18 mg de extracto puro de alcaloides, es decir, 0.18 mg por cada 1 mL de látex.

Posteriormente, se reconstituyeron los 18 mg de extracto de alcaloides con 10 mL de metanol, dando una concentración de 0.01g por cada 10 mL, el mismo que transformando nos da como resultado 1000 ppm de extracto total.

$$\text{Cr} = \frac{0.01\text{g}}{10\text{mL}} = \frac{1 \times 10^{-3}\text{g}}{\text{mL}} = \frac{1 \text{ mg}}{\text{mL}} = 1000 \text{ ppm}$$

3.3.1.1 MÉTODO No. 2

Balón vacío: 116.917 g

Balón + extracto: 116.942 g

$$\text{EXTRACTO TOTAL} = \text{BALÓN + EXTRACTO (peso 2)} - \text{BALÓN VACÍO (peso 1)}$$

$$\text{EXTRACTO TOTAL} = 116.942 \text{ g} - 116.917 \text{ g}$$

$$\text{EXTRACTOTOTAL} = 0.025 \text{ g} = 25 \text{ mg}$$

Esto indica que por cada 100 mL de látex se puede obtener 25 mg de extracto puro de alcaloides, es decir, 0.25 mg por cada 1 mL de látex.

Posteriormente, se reconstituyeron los 25 mg de extracto de alcaloides con 10 mL de metanol, dando una concentración de 0.02 g por cada 10 mL, el mismo que transformando nos da como resultado 2000 ppm de extracto total.

$$Cr = \frac{0.02 \text{ g}}{10 \text{ mL}} = \frac{2 \times 10^{-3} \text{ g}}{\text{mL}} = \frac{2 \text{ mg}}{\text{mL}} = 2000 \text{ ppm}$$

3.4 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA PARA ALCALOIDES

Al realizar la cromatografía en capa fina (CCF) con el extracto puro obtenido, se pudo observar la posible presencia del alcaloide bufotenina, resultado que se evidenció al ser observado en primera instancia a la luz ultravioleta (254 nm) con el revelador Dragendorff y, en segundo término, aspergeando con el revelador de NaNO_2 10% y observando a la luz normal, tal y como se puede apreciar en la Foto No.1.

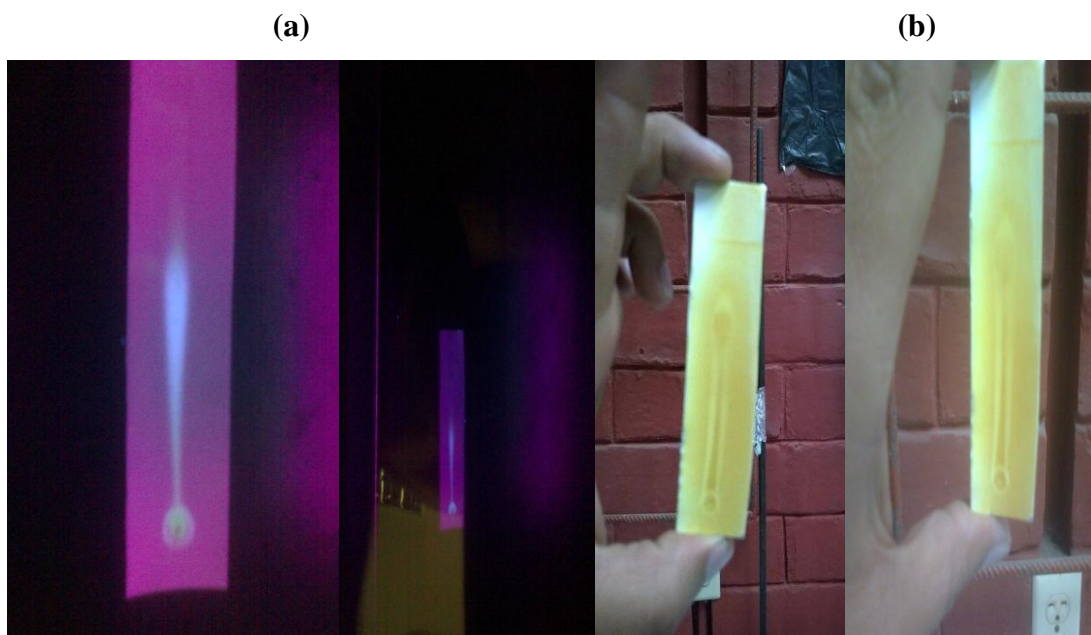


FOTO No. 1 Cromatografía en capa fina (CCF) de extracto puro de alcaloides según condiciones tomadas de (Moffat, A. 2011)
(a) Revelador Dragendorff; (b) Revelador NaNO_2 10%

Parámetros utilizados de referencia:

FM: MeOH + $\text{NH}_3(\text{c})$ (10:0.15)

Activador de placa: KOH 0.1 M (disuelto en metanol)

Revelador Dragendorff: 1mL solución stock (A+B) + 2mL Ac. Acético glacial + 10 mL de agua destilada.

Rf: 0.35

El cálculo del factor de retardamiento (Rf) que ayudó a saber si se podría tratar del alcaloide bufotenina o similares. Teniendo como parámetro el valor de referencia de Rf: 0.35 (Moffat, A. 2011), se procedió a calcular y se obtuvo un valor de $\text{Rf} = 0.33$. Esto indicó un valor muy similar al de referencia, lo que nos da a interpretar que posiblemente se trate de la bufotenina o un compuesto similar.

Se puede deducir que se diferencio esta pequeña mancha, ya que se cargó la placa con poco extracto alcaloideo exactamente con 25 μL .

Rf = distancia recorrida por el compuesto (X) / distancia recorrida por el eluyente (Y)

X= 2.7 cm

Y= 8.1 cm

Rf= 2.7/8.1

Rf= 0.33

3.5 DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS Y FÍSICAS DEL EXTRACTO ALCALOIDEO

CUADRO No. 9 PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS Y FÍSICAS DEL EXTRACTO ALCALOIDEO. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. OCTUBRE 2014

PROPIEDADES	RESULTADO
Color	Levemente amarillo
Olor	Poco fuerte y penetrante
Aspecto	Limpio sin partículas
Índice de refracción	1.48
pH	5.3

Se pudo observar que este extracto era de color levemente amarillento, sin presencia de partículas, al mismo tiempo poseía un olor un poco fuerte y penetrante. Su aspecto era de apariencia limpia sin partículas, con un índice de refracción de 1.48 lo que nos indica que se trata de un compuesto puro, con un pH de 5.3 conociendo que el extracto es levemente ácido.

3.7 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ALCALOIDEO

La determinación de la actividad antibacteriana se llevó a cabo mediante el método de Mitscher partiendo de una concentración de 2000 ppm del extracto de alcaloides puro.

3.7.1 MÉTODO DE MITSCHER

CUADRO No. 10 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ALCALOIDEO DE *Brosimum utile* (LÁTEX) POR EL MÉTODO DE MITSCHER. *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. LABORATORIO DE DESARROLLO E INVESTIGACIÓN. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. NOVIEMBRE 2014

24 HORAS				
MICROORGANISMO	1000 µL MetOH (control positivo)	Sin extracto (blanco)	200 µg extracto	2000 µg extracto
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 1025	I	I	I	A
<i>Escherichia coli</i> ATCC 3522	I	I	I	A

A=Actividad P=Parcialmente activo I=Inactivo

De acuerdo a los datos expresados en el cuadro No. 10, se puede observar que el extracto alcaloideo de *Brosimum utile* carece de actividad antibacteriana a concentraciones de 200µg, pero en concentraciones de 2000 µg sí tiene actividad. Este resultado condujo a la realización de diferentes diluciones entre 200 y 2000 µg de extracto alcaloideo.

CUADRO No. 11 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ALCALOIDEO DE *Brosimum utile* (LÁTEX) POR EL MÉTODO DE MITSCHER. CONCENTRACIONES DE 200 y 2000 µg.

24 HORAS							
MICROORGANISMO	1000 µL MetOH (control positivo)	Sin extracto (blanco)	2000 µg extracto	1000 µg extracto	500 µg extracto	250 µg extracto	200 µg extracto
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 1025	I	I	A	I	I	I	I
<i>Escherichia coli</i> ATCC 3522	I	I	A	I	I	I	I

A=Actividad P=Parcialmente activo I=Inactivo

De acuerdo a los datos expresados en el cuadro No. 11, se puede observar que a diluciones de 1000, 500, 250 y 200µg no hubo actividad antibacteriana, al igual que en el control positivo y el blanco; pero a 2000 µg sí existió actividad, lo que indicó que se debían realizar diluciones del extracto entre 1000 y 200µg.

CUADRO No. 12 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ALCALOIDEO DE *Brosimum utile* (LÁTEX) POR EL MÉTODO DE MITSCHER. CONCENTRACIONES DE 1000 y 200 µg. LABORATORIO DE DESARROLLO E INVESTIGACIÓN. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. NOVIEMBRE 2014

24 HORAS								
MICROORGANISMO	1000 µL MetOH (control positivo)	Sin extracto (blanco)	2000 µg extracto	1800 µg extracto	1600 µg extracto	1400 µg extracto	1200 µg extracto	1000 µg extracto
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 1025	I	I	A	A	A	I	I	I
<i>Escherichia coli</i> ATCC 3522	I	I	A	A	A	I	I	I

A=Actividad P=Parcialmente activo I=Inactivo

De acuerdo a los datos expresados en el cuadro No. 12, se puede observar que en estas nuevas concentraciones a 1400, 1200 y 1000 µg de extracto no existe actividad, sin embargo a 2000, 1800 y 1600 µg de extracto ya existe actividad; lo que indica aproximación a la concentración exacta de actividad, es por eso que se tuvo aplicar concentraciones entre 1400 y 2000 µg de extracto alcaloideo.

CUADRO No. 13 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ALCALOIDEO DE *Brosimum utile* (LÁTEX) POR EL MÉTODO DE MITSCHER. CONCENTRACIONES DE 1400 y 2000 µg LABORATORIO DE DESARROLLO E INVESTIGACIÓN. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. NOVIEMBRE 2014

24 HORAS							
MICROORGANISMO	1000 µL (control positivo)	Sin extracto (blanco)	2000 µg extracto	1800 µg extracto	1600 µg extracto	1500 µg extracto	1400 µg extracto
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 1025	I	I	A	A	A	I	I
<i>Escherichia coli</i> ATCC 3522	I	I	A	A	A	I	I

A=Actividad P=Parcialmente activo I=Inactivo

De acuerdo a los datos expresados en el cuadro No. 13, se puede observar que a concentraciones de 1400 y 1500 µg no existe actividad. Pero desde 1600 µg de concentración empieza la actividad, confirmando de igual forma lo que ocurre en el cuadro anterior No. 11, es decir que la concentración mínima inhibitoria (CMI) para bacterias se presenta en 1600 µg de extracto alcaloideo puro.

3.7.1.1 Calculo de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para bacterias

$$2 \text{ mg} \text{ ————— } 1 \text{ mL}$$

$$X \text{ ————— } 0.8 \text{ mL}$$

$$Cr = \frac{2mg \times 0.8mL}{1mL}$$

$$Cr = 1.6mg$$

$$1 \text{ µg} = 0.001 \text{ mg}$$

$$1 \text{ µg} \text{ ————— } 0.001 \text{ mg}$$

$$X \text{ ————— } 1.6 \text{ mg}$$

$$X = 1600 \text{ µg}$$

$$CMI = 1600 \text{ µg}$$

CUADRO No. 14 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ALCALOIDEO DE *Brosimum utile* (LÁTEX) POR EL MÉTODO DE MITSCHER. *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas Aeruginosa*. CONCENTRACIONES DE 1400 y 2000 µg.

24 HORAS							
MICROORGANISMO	1000 μL MetOH (control positivo)	Sin extracto (blanco)	2000 μg extracto	1800 μg extracto	1600 μg extracto	1500 μg extracto	1400 μg extracto
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 1224	I	I	A	A	A	I	I
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 1652	I	I	A	A	A	I	I

A=Actividad P=Parcialmente activo I=Inactivo

De acuerdo a los datos expresados en el cuadro No. 14, se pudo observar con otras especies de microorganismos que de igual forma la actividad comienza desde 1600 μg de extracto puro, lo que se confirma la CMI, establecida anteriormente.

CUADRO No. 15 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ALCALOIDEO DE *Brosimum utile* (LÁTEX) POR EL MÉTODO DE MITSCHER. *Cándida albicans*. CONCENTRACIONES DE 1400 y 2000 μg LABORATORIO DE DESARROLLO E INVESTIGACIÓN. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. DICIEMBRE 2014

48 HORAS							
MICROORGANISMO	1000 μL MetOH (control positivo)	Sin extracto (blanco)	2000 μg extracto	1800 μg extracto	1600 μg extracto	1500 μg extracto	1400 μg extracto
<i>Cándida albicans</i> ATCC 2533	I	I	A	A	A	I	I

A=Actividad P=Parcialmente activo I=Inactivo

De acuerdo a los datos expresados en el cuadro No. 15, también se aplicó la técnica de Mitscher para *Cándida albicans* siendo este agente un hongo y no una bacteria, observándose que existe actividad desde la concentración de 1600 μg de extracto puro. Lo que confirmó que a esta concentración presenta actividad el extracto frente a hongos.

3.8 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO ALCALOIDEO

3.8.1 MÉTODO DIFUSIÓN EN AGAR CON DISCO (HONGOS)

CUADRO No. 16 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIDERMATÓFICA DEL EXTRACTO ALCALOIDEO DE *Brosimum utile* (LÁTEX) POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR CON DISCO. *Trichophyton rubrum* y *Epidermophyton floccosum*. CONCENTRACIONES DE 1600 y 2000 µg LABORATORIO DE DESARROLLO E INVESTIGACIÓN. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. DICIEMBRE 2014

7 DÍAS				
MICROORGANISMO	1000 µL MetOH (control positivo)	Sin extracto (blanco)	2000 µg extracto	1600 µg extracto
<i>Trichophyton rubrum</i>	I	I	A	I
<i>Epidermophyton floccosum</i>	I	I	A	I

A=Actividad P=Parcialmente activo I=Inactivo

De acuerdo a los datos expresados en el cuadro No. 16, se observó que tanto en el control positivo (metanol), el blanco y a la concentración de 1600 µg de extracto puro no existe actividad. En cambio, aplicando 2000 µg de extracto puro si existe actividad; formándose halos de inhibición tanto para *Trichophyton rubrum* como para *Epidermophyton floccosum*.

CUADRO No. 17 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIDERMATÓFICA DEL EXTRACTO ALCALOIDEO DE *Brosimum utile* (LÁTEX) POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR CON DISCO. MEDICIÓN DE HALOS. PRIMER Y SEGUNDO ENSAYO. LABORATORIO DE DESARROLLO E INVESTIGACIÓN. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. DICIEMBRE 2014

Formación de halos (mm)				
MICROORGANISMO	Primer ensayo			
	1 ml MetOH (control positivo)	Sin extracto (blanco)	2000 µg extracto	1600 µg extracto
<i>Trichophyton rubrum</i>	0	0	20	0
<i>Epidermophyton floccosum</i>	0	0	18	0
Formación de halos (mm)				
MICROORGANISMO	Segundo ensayo			
	1 ml MetOH (control positivo)	Sin extracto (blanco)	2000 µg extracto	1600 µg extracto
<i>Trichophyton rubrum</i>	0	0	19	0
<i>Epidermophyton floccosum</i>	0	0	17	0

De acuerdo a los datos expresados en el cuadro No. 17, podemos observar que a 1600 µg de extracto no se dio la formación de halos, sin embargo a 2000 µg de extracto puro se da la formación de halos, cuyos diámetros fueron determinados dando como resultado para *Trichophyton rubrum* un halo de 20 mm y otro de 19 mm; y para *Epidermophyton floccosum* un halo de 18 y 17 mm.

Al comparar los resultados obtenidos con el método de Kirby Bauer. (Sham, d. 1996). Se pudo observar que el tamaño de los halos nos indica en promedio que estos hongos se encuentran en la escala de ser susceptibles al extracto.

3.7.1.2 Cálculo de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para hongos dermatofitos

$$2 \text{ mg} \text{ ————— } 1 \text{ mL}$$

$$X \text{ ————— } 1 \text{ mL}$$

$$Cr = \frac{2mg \times 1mL}{1mL}$$

$$Cr = 2mg$$

$$1 \mu g = 0.001 \text{ mg}$$

$$1 \mu g \text{ ————— } 0.001 \text{ mg}$$

$$X \text{ ————— } 2 \text{ mg}$$

$$X = 2000 \mu g$$

$$CMI = 2000 \mu g$$

3.9 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ALCALOIDES FRENTE A HONGOS Y BACTERIAS

Se presume que el principal mecanismo de acción de los alcaloides se da mediante la acción de estos metabolitos sobre el material genético de las bacterias y hongos. Los alcaloides suelen tener efecto tóxico sobre el DNA del microorganismo, el cual llega a perder su estructura helicoidal y se fragmenta, lo que conlleva a la pérdida de su funcionalidad y a la imposibilidad de sintetizar proteínas fundamentales en el metabolismo de los microorganismos y, de esta forma, el microorganismo muere.

CONCLUSIONES

1. En el látex de la especie vegetal *Brosimum utile* se identificaron los grupos fitoquímico siguientes: alcaloides, triterpenos, esteroides, grasas y aceites. Además de una gran cantidad de resinas y gomas, características del látex.
2. El extracto acuoso fue el que mejor *evidenció la* presencia de alcaloides, dando como resultado positivo en las pruebas de Dragendorff, Mayer y Wagner.
3. Para la obtención del extracto puro de alcaloides se establecieron dos métodos debido a la existencia de diferente comportamiento entre los dos látex utilizados, siendo el cloroformo el solvente de purificación, en ambos casos.
3. Mediante cromatografía en capa fina se observó la presencia de una banda con $R_f=33$, correspondiente posiblemente al alcaloide bufotenina o similares.
4. Al utilizar el método difusión en Agar con Disco se confirmó que el extracto alcaloideo puro del látex de *Brosimum utile* a la concentración de 2 mg tiene actividad antidermatófica frente a hongos como *Trichophyton rubrum* y *Epidermophyton floccosum*, dando como resultado positivo debido a la formación de halos de 20 y 19 mm y 18 y 17 mm respectivamente, estableciéndose como hongos susceptibles frente al extracto.
5. Mediante el método de Mitscher se comprobó que el extracto alcaloideo de *Brosimum utile* (látex) además de su actividad antidermatófica posee actividad antimicrobiana frente a agentes patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Cándida albicans*.

6. Se determinó que la concentración mínima inhibitoria (CMI) para bacterias del extracto alcaloideo de *Brosimum utile* (látex) es de 1600 µg de extracto puro y para hongos dermatofitos de 2000 µg de extracto puro, los mismos que fueron obtenidos de la dilución de 0.02 g de extracto puro en 10 ml de metanol, equivalente a 2000 ppm.

RECOMENDACIONES

1. Se debe utilizar la muestra vegetal, en este caso látex lo más fresca posible, debido a que en el transcurso de los días se va espesando y pueden ocurrir diferentes cambios que pueden alterar el análisis.
2. Al momento de la reactivación de los hongos dermatofitos ATCC (American Type Culture Collection), los caldos de malta que se encuentran en el Erlenmeyer con los microorganismos se deben homogenizar en un tiempo determinado para aumentar la oxigenación y evitar la sedimentación, y de esta manera exista mayor crecimiento.
3. Observar las cajas ya sembradas en el tiempo exacto que dice la técnica, (ej. 18-24 horas) para así evitar crecimientos exagerados o no crecimientos y confundir los resultados dando valores falsos.
4. Se deben tomar en cuenta todas las normas de bioseguridad, utilizando los equipos de protección personal correctos (EPP), ya que se utilizan agentes patógenos de alta peligrosidad.
5. Al observar que este extracto posee también actividad antibacteriana, se aconseja continuar los estudios con el objetivo de obtener un posible antibiótico de amplio espectro, ya que puede ayudar a combatir patologías producidas tanto por bacterias Gram-positivas o Gram-negativas.
6. Identificar estructuras de los alcaloides presentes en el extracto de alcaloides
7. Luego de conocer la actividad antifúngica del extracto de *Brosimum utile* (látex), se recomienda la continuación de este estudio más detalladamente, para así desarrollar un fitofármaco con propiedades antidermatólicas.

BIBLIOGRAFÍA

1. **AMAN, S., et al.** Itraconazole pulse therapy in the treatment of disto-lateral subungual onychomycosis. 2.ed. London- England. Bloomsbury Publishing. 2003, pp. 618-620.
2. **BAZALAR, J., David.** Acción inhibitoria de crecimiento de la asociación de los extractos acuosos de *Erythroxylum novogranatense* var. *Truxyllum* y *Plantago* mayor frente a bacterias y hongos. (Tesis). (BQF). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Ciencia e Investigación. Escuela de Química y Farmacia. Lima-Perú. 1998, pp. 145-148.
3. **BEDOUT, C., et al.** Evaluación de la susceptibilidad de especies de *Cándida* al fluconazol por el método de difusión de disco. Biomédica.Valdivia-Chile. 2003, pp. 17-31.
4. **BERG, C.** Olmedieae und Brosimae. Flora Neotropica. 7.ed. Florida- EEUU. Hafner Publishing Company. 1992, pp. 229.
5. **BERRIOS, V.** Determinación por el Método Mitscher de la actividad antimicrobiana de 15 aceites esenciales extraídos de la flora salvadoreña. Trabajo de graduación para optar al título de Licenciado en Química y Farmacia (Tesis). (BQF). Universidad de El Salvador. Facultad de Farmacia. San Salvador. El Salvador. 2001, pp. 685-690
6. **BRACK EA.** Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú. Programa de las Naciones Unidas para el desarrollo. Cuzco-Perú. Centro de Estudios Regionales Andinos Bartolomé de Las Casas. 2000, pp. 46-77
[http://D:/Mis%20documentos/Downloads/1340-7039-1-PB%20\(2\).pdf](http://D:/Mis%20documentos/Downloads/1340-7039-1-PB%20(2).pdf)
2014/10/05

7. **BRUNETON J.** Plantas Medicinales. Fitoquímica y Farmacognosia. 2.ed. Zaragoza-España. Acribia. 2001, pp. 145-168.
<http://farmacognosia-farmacauladech.blogspot.com>.
2014/06/12.
8. **BURNS, R.M.**, et al. Árboles Útiles de la Parte Tropical de América del Norte. Comisión Forestal de América del Norte. Washington DC, EE-UU. 1998, pp. 345-388
9. **CHANG, R.** Química. 10.ed. México-México. Mc Graw Hill. 2010, pp. 23-60
10. **CLAVELL, L.**, et al. Microbiología. Manual de Métodos Generales. 2da edición. Caracas-Venezuela. 1992, pp. 89-97
11. **CSERHATI, T.**, et al. Trends in Thin Layer Chromatography. Chromatogr. Sci. Barcelona- España. 1997, pp. 35, 383-391.
12. **DAVIDSE, G.**, et al. Scientific classification of Brosimum utile. Knapp & F. Chiang Cabrera. Albama- EEUU. Saururaceae a Zygophyllaceae. 2013, pp. 235-290.
<http://es.Scientific classification of Brosimum utile org/wiki/Brosimum utile>.
2014/22/05
13. **DÍAZ, L.**, et al. Activity of ethanolic extracts leaves of Machaerium floribundum against acne-inducing bacteria, and their cytoprotective and antioxidant effects on fibroblast Rev. Lima- Perú. 2011, pp. 153-158.
14. **DORMAN, H.**, et al. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. J. Appl. Microbio. Barcelona –España. 2000, pp. 366-373.
<http://books.google.com.sv/books?id=vSER3U0C&pg=PA406&dq=Dorman+HJ>
2014/09/19

15. **FERNÁNDEZ, T., BELKYS, L.** Sensibilidad antifúngica a los dermatofitos. Reus. (Tesis doctoral). (PHD). Universidad Rovira i Virgili, Facultad de Medicina y Ciencias de la salud, Departamento de Ciencias Médicas Básicas. Valdivia-Chile. 2005, pp. 124-128.
16. **GRIN, L.** Departamento de Agricultura de los Estados Unidos Germplasm Resources Information Network. California -EEUU. 2005, pp. 467-530.
17. **GONZALEZ, J.** et al. Fitoquímica de Química. Universidad de Salamanca. Salamanca-Spain. 1987, pp. 754-780
18. **GUSTAVO E.** et al. Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Lima-Perú. 2008, pp. 23-60
<http://ecaths1.s3.amazonaws.com/catmicromed/APUNTE%20Micosis%20oportunistas.pdf>
2014/06/28
19. **HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ.** Actualidades en Micología Médica 5.ed. UNAM. México- México. 2010, pp. 69-95
<http://micologiadzib.blogspot.com>
2014/05/20
20. **KUMATE, J.** et al. Infecciones en la piel y tejidos blandos. Infectología Clínica. 7.ed. México. 2008, Capítulo 41, pp. 455-467.
21. **LEE, M.,** et al. Synthesis transport and accumulation of quinolizidine alkaloids in *Lupinus albus* L. and *L. angustifolius* Journal of Experimental Botany. Australia. 2006, pp. 1-12.
22. **LOCK DE UGAZ O.** Investigación Fitoquímica. Métodos en el Estudio de los Productos Naturales. Universidad Católica del Perú. Lima. 1994, pp. 167-195

23. **MALAGON, O., et al.** Composition of the essential oils of four medicinal plants from Ecuador. Quito -Ecuador. 2003, pp. 527-553.
24. **MARTÍNEZ, Y., et al.** Cultivos y utilizacion de plantas medicinales. 2.ed. Buenos Aires. 2000, pp. 63-70.
25. **MIMS, C. A., et al.** Microbiología Médica. Harcourt Brace. Valencia-España. 1999, pp. 198-185
<http://dspace.ucbscz.edu.bo/dspace/handle/123456789/8167>.
2014/06/18
26. **MIRANDA, M.** Farmacognosia y productos naturales. Universidad de la Habana. Habana-Cuba. 2006, pp. 32-44, 56-62.
27. **MOFFAT, A., et al** Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. 4.ed. London Chicago. 2011, pp. 434-498.
28. **MUÑOZ, J.** Guía para el Análisis de Vegetales. 2.ed. Quito-Ecuador. 1982, pp. 66-95
29. **MURRAY R.** The Natural Coumarins. Ocurrance, Chemistry and Biochemistry. Scientia Et Technica. Universidad Tecnológica de Pereira Colombia. Pereira-Colombia. 1992, pp. 129-131
30. **REX JH., et al.** Antifungal Susceptibility Testing: Practical Aspects and Current Challenges. Clin Microbiol Rew. 2011, pp. 236-360.
http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-8720030
2014/06/22

31. **ROIG J.** Plantas aromáticas y venenosas. 4.ed. La Habana- Cuba. 1998, pp. 407
32. **SHAM, D.** The role of clinical microbiology in the control and surveillance of antimicrobial resistance. Zaragoza-Span. ASM News. 1996, pp. 62:259
33. **TAYLOR, C.** Defense responses in plants and animals-more of the same, Plant cell. Georgia-EEUU. 1998, pp. 873-876.
[http://D:/Mis%20documentos/Downloads/DialnetEvaluacionPreliminarDeLaActividadFungicidaDeLosAce-3631002%20\(1\).pdf](http://D:/Mis%20documentos/Downloads/DialnetEvaluacionPreliminarDeLaActividadFungicidaDeLosAce-3631002%20(1).pdf)
2014/05/12

ANEXOS

ANEXO No. 1

RECOLECCIÓN DE LA MATERIA PRIMA



FOTO No. 1 Ciudad de Lago Agrio, Parroquia Dureno, Comunidad Cofán, identificación de la especie *Brosimum utile*.

ANEXO No. 2 MATERIA PRIMA



FOTO No. 2 Látex de la especie *Brosimum utile*.

ANEXO No. 3 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS



FOTO No. 3 Obtención de extractos para ser utilizados en el tamizaje fitoquímico.

ANEXO No. 4 TAMIZAJE FITOQUÍMICO



FOTO No. 4 Pruebas del tamizaje realizadas con los diferentes extractos de *Brosimum utile*.

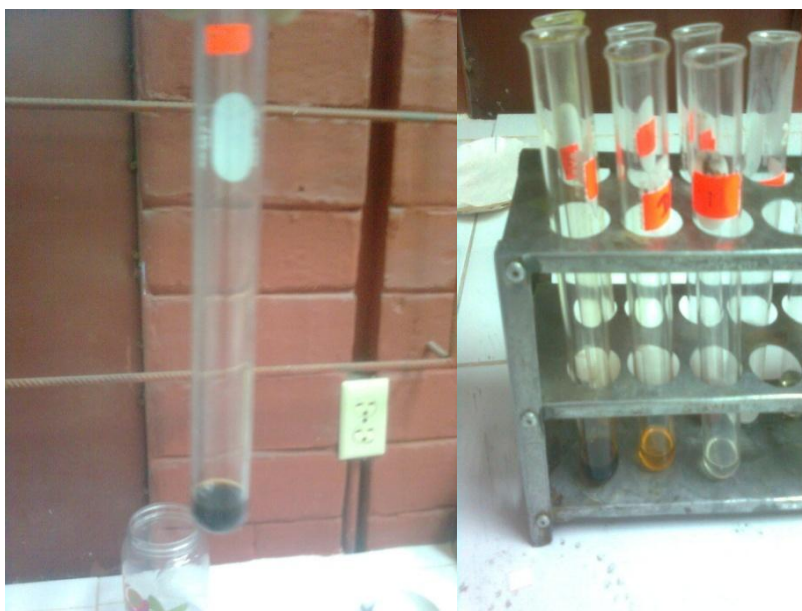


FOTO No. 5 Prueba de Liebermann-Buchart positiva en el extracto etéreo, presencia de triterpenos o esteroides.



FOTO No. 6 Prueba de Resinas positiva en el extracto alcohólico, presencia de gomas y resinas.

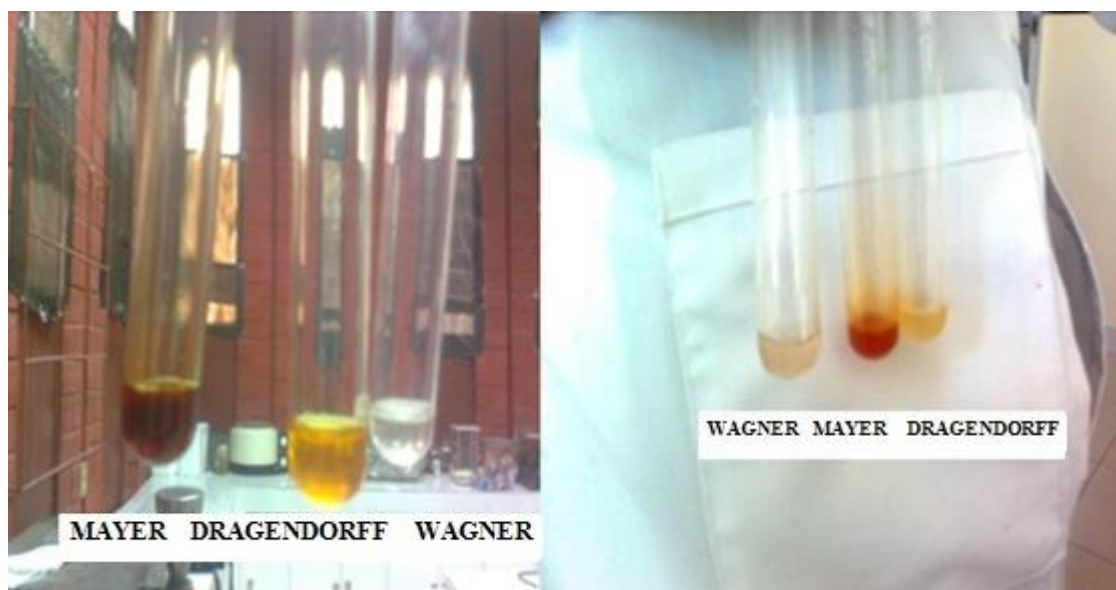


FOTO No. 7 Prueba de alcaloides en el extracto acuoso, positivo para Dragendorff, Mayer y Wagner.

ANEXO No. 5 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ALCALOIDEO



FOTO No. 8 Filtración al vacío de la mezcla látex + metanol



FOTO No. 9 Basificación del extracto con $\text{NH}_4\text{OH(c)}$ hasta pH 9



FOTO No. 10 Purificación y separación entre la fase orgánica y la acuosa con CHCl_3



FOTO No. 11 Concentración al vacío de la fase orgánica en el rotavapor a 40°C

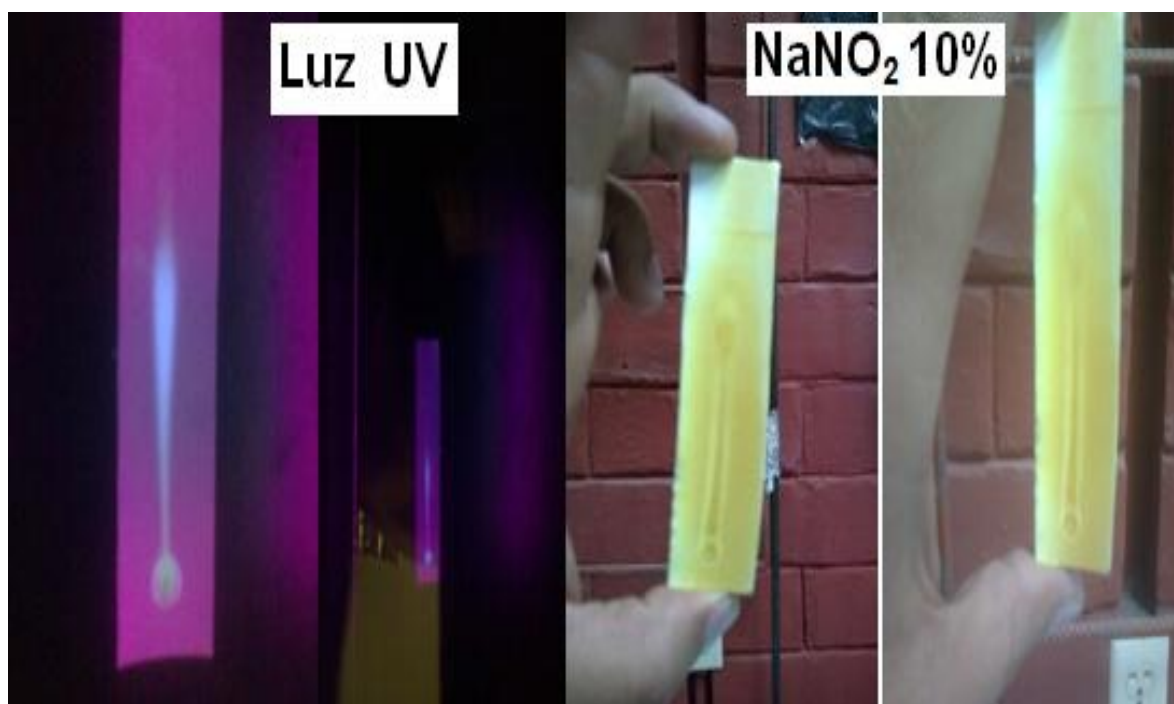


FOTO No. 12 TLC confirmación del alcaloide Bufotenina

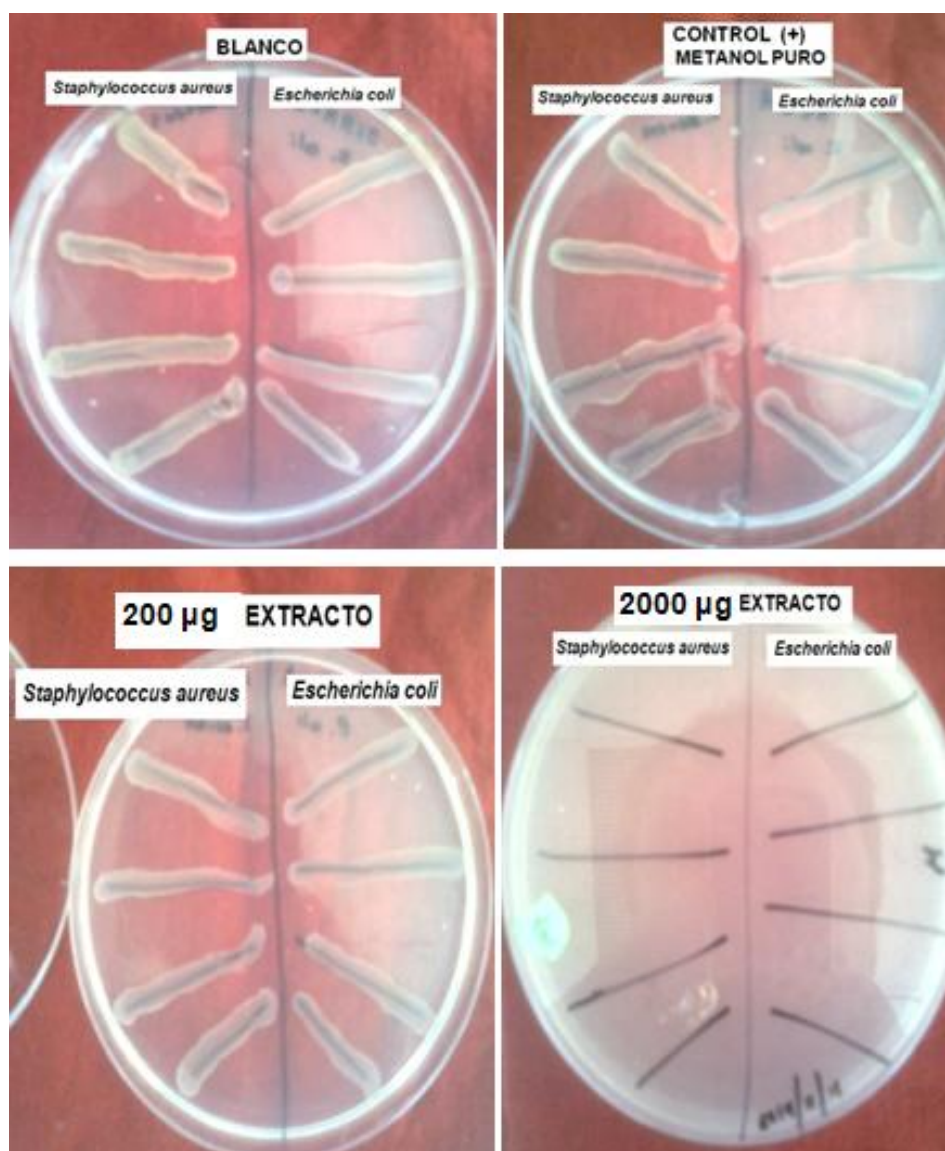


FOTO No. 13 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ALCALOIDEO DE *Brosimum utile* (LÁTEX) POR EL MÉTODO DE MITSCHER. CONCENTRACIONES DE 200 Y 2000 µg, BLANCO Y CONTROL POSITIVO (+). *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

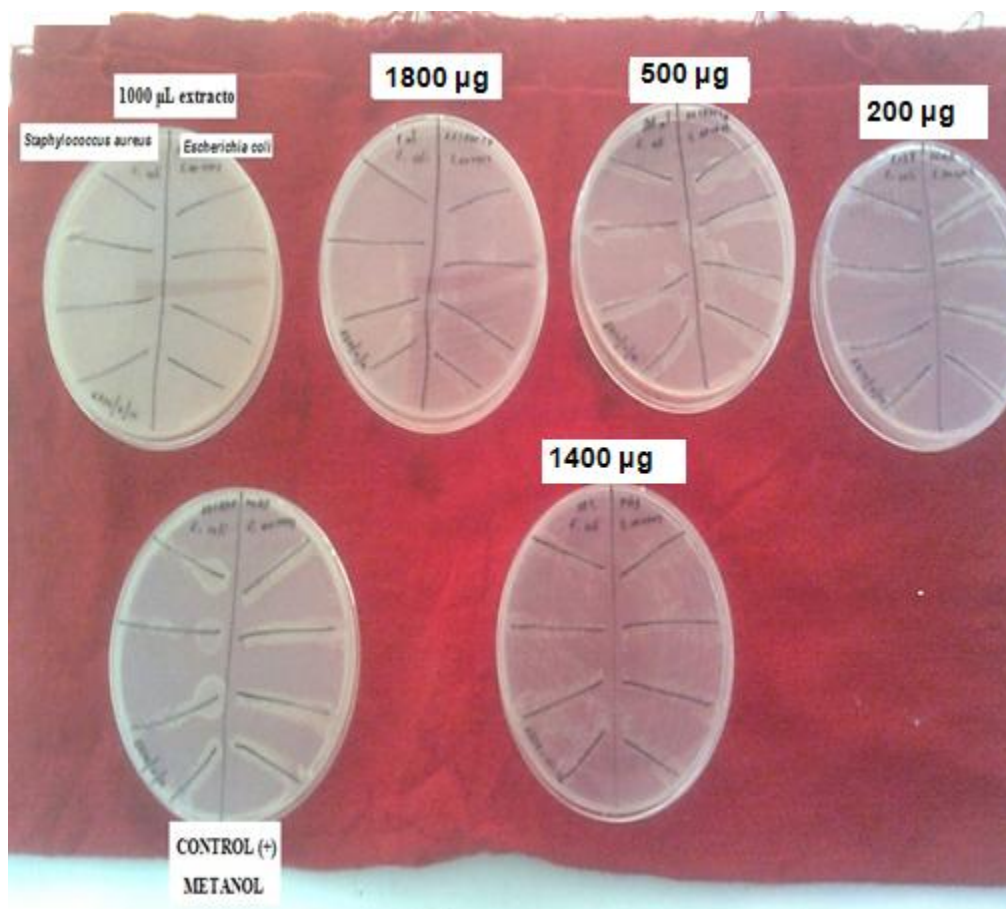


FOTO No. 14 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ALCALOIDEO DE *Brosimum utile* (LÁTEX) POR EL MÉTODO DE MITSCHER. CONCENTRACIONES DE 200 a 2000 µg.. *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

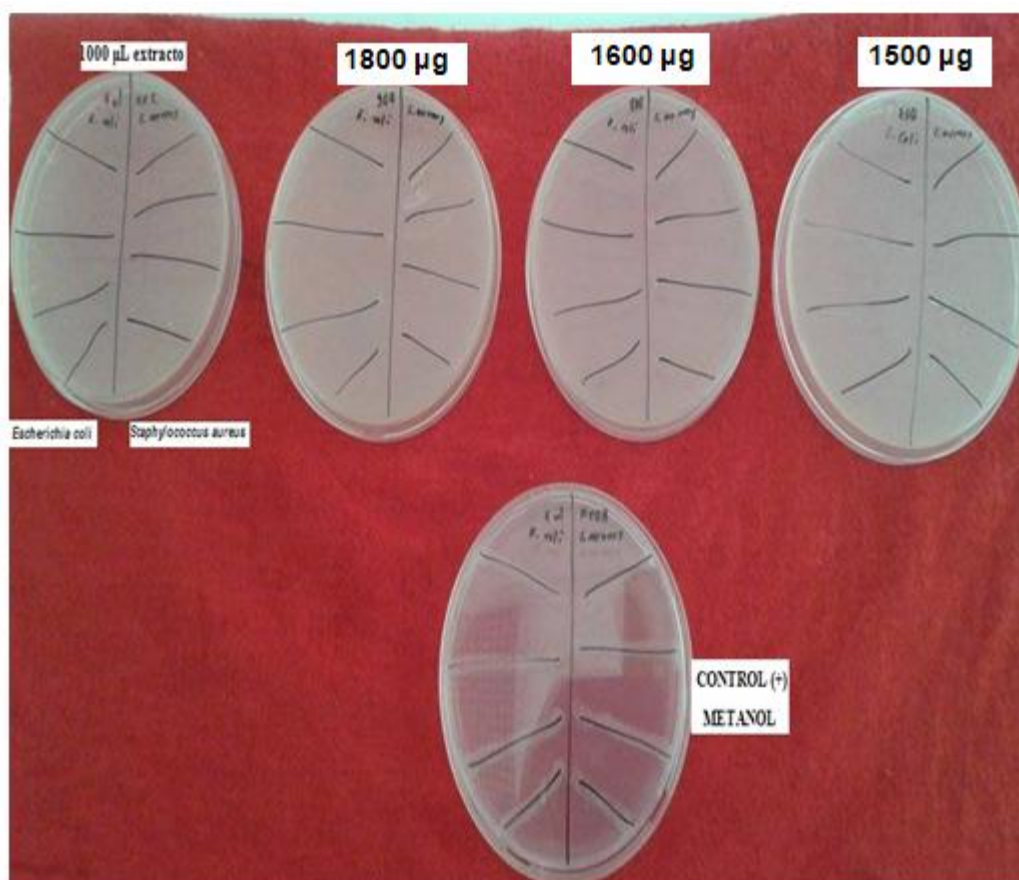


FOTO No. 15 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ALCALOIDEO DE *Brosimum utile* (LÁTEX) POR EL MÉTODO DE MITSCHER. CONCENTRACIONES DE 1500 a 2000 µg. *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

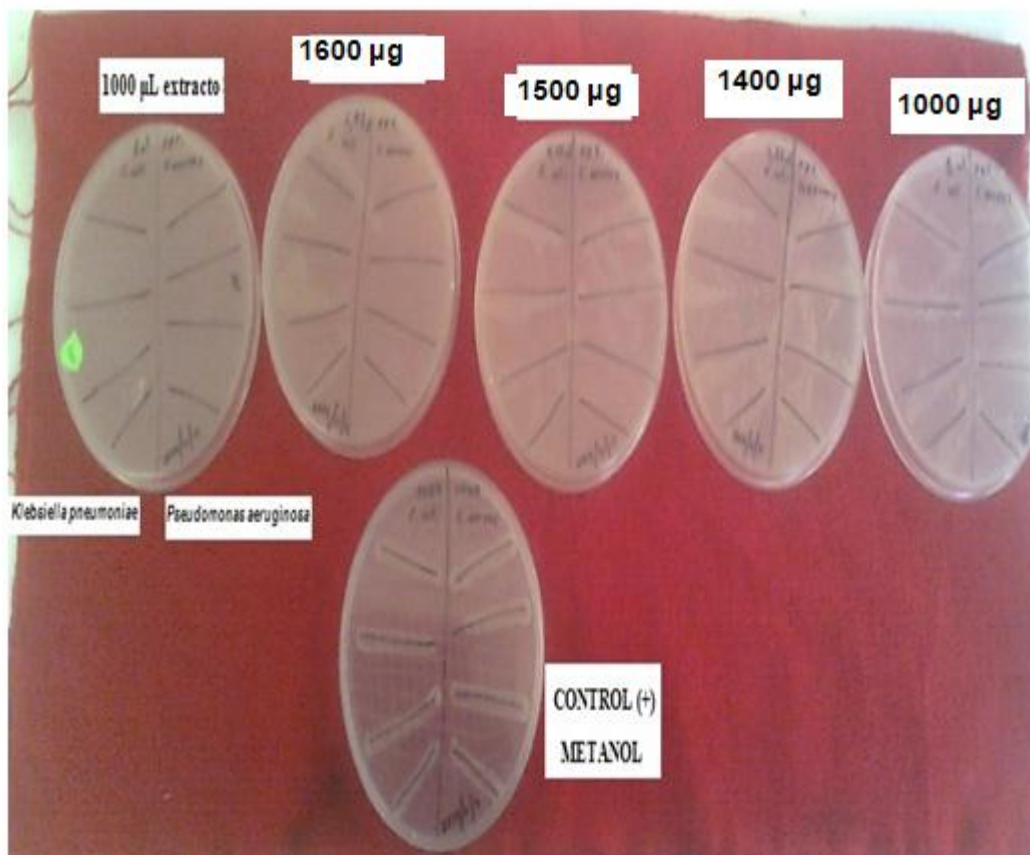


FOTO No. 16 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ALCALOIDEO DE *Brosimum utile* (LÁTEX) POR EL MÉTODO DE MITSCHER. CONCENTRACIONES DE 1000 a 2000 µg. *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*.

ANEXO No. 7 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIDERMATÓFICA DEL EXTRACTO ALCALOIDEO



FOTO No. 17 SIEMBRA DE HONGOS DERMATOFITOS *Trichophyton rubrum* y *Epidermophyton floccosum*

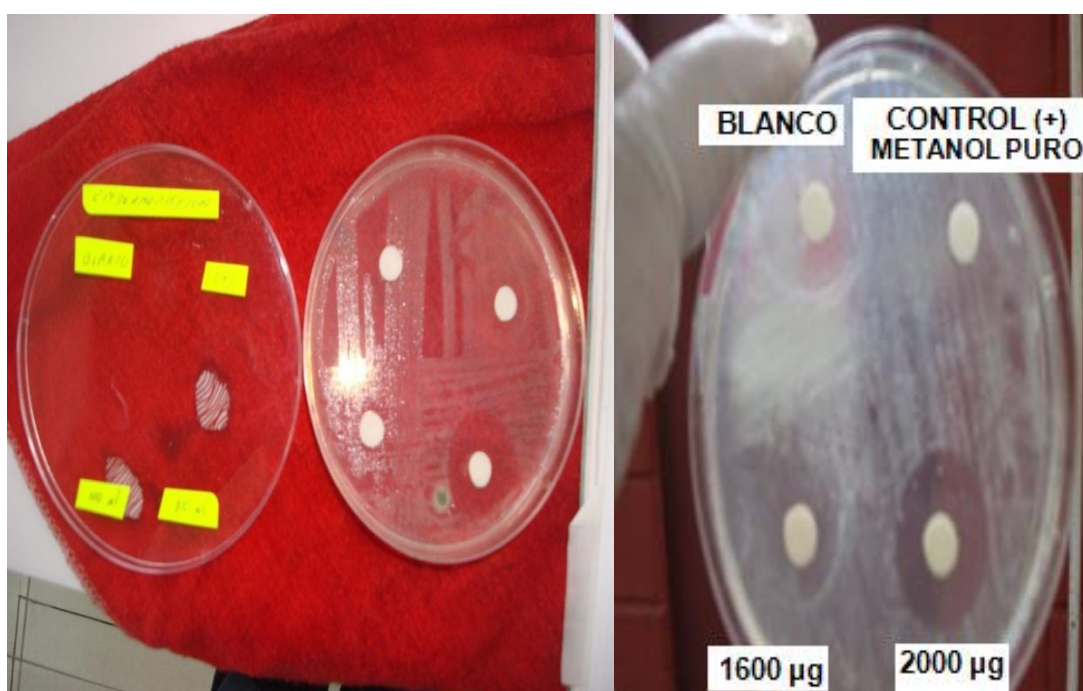


FOTO No. 18 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIDERMATÓFICA DEL EXTRACTO ALCALOIDEO DE *Brosimum utile* (LÁTEX) POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR CON DISCO. *Epidermophyton floccosum*. (Primer ensayo)



FOTO No. 19 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIDERMATÓFICA DEL EXTRACTO ALCALOIDEO DE *Brosimum utile* (LÁTEX) POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR CON DISCO. *Epidermophyton floccosum*. (Segundo ensayo)

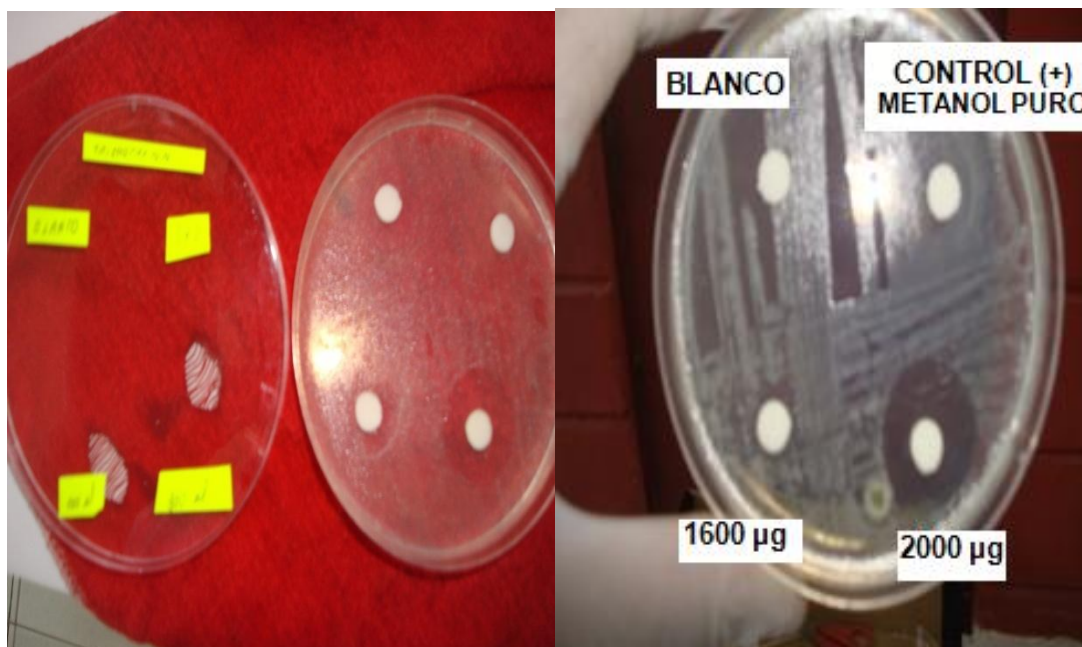


FOTO No. 20 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIDERMATÓFICA DEL EXTRACTO ALCALOIDEO DE *Brosimum utile* (LÁTEX) POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR CON DISCO. *Trichophyton rubrum*. (Primer ensayo)

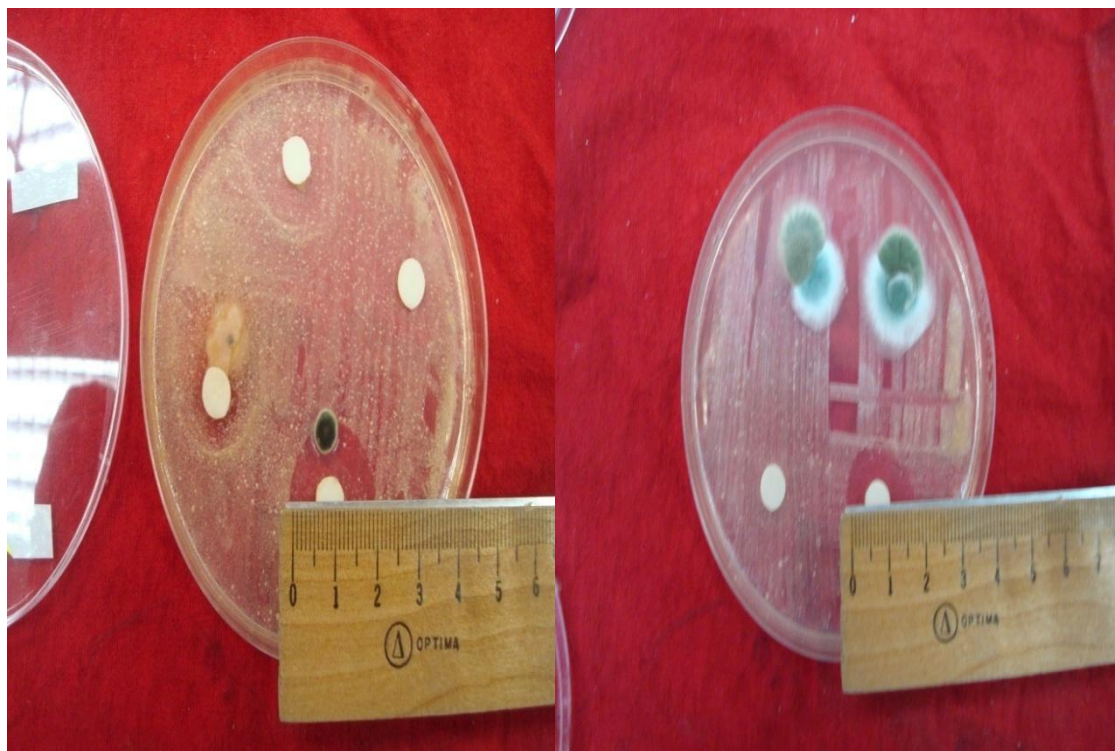


FOTO No. 21 MEDICION DE LOS HALOS DE INHIBICION EN MILIMETROS DE LA ACTIVIDAD ANTIDERMATÓFICA DEL EXTRACTO ALCALOIDEO DE *Brosimum utile* (LÁTEX) POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR CON DISCO. *Epidermophyton floccosum* y *Trichophyton rubrum*.